芽胞杆菌

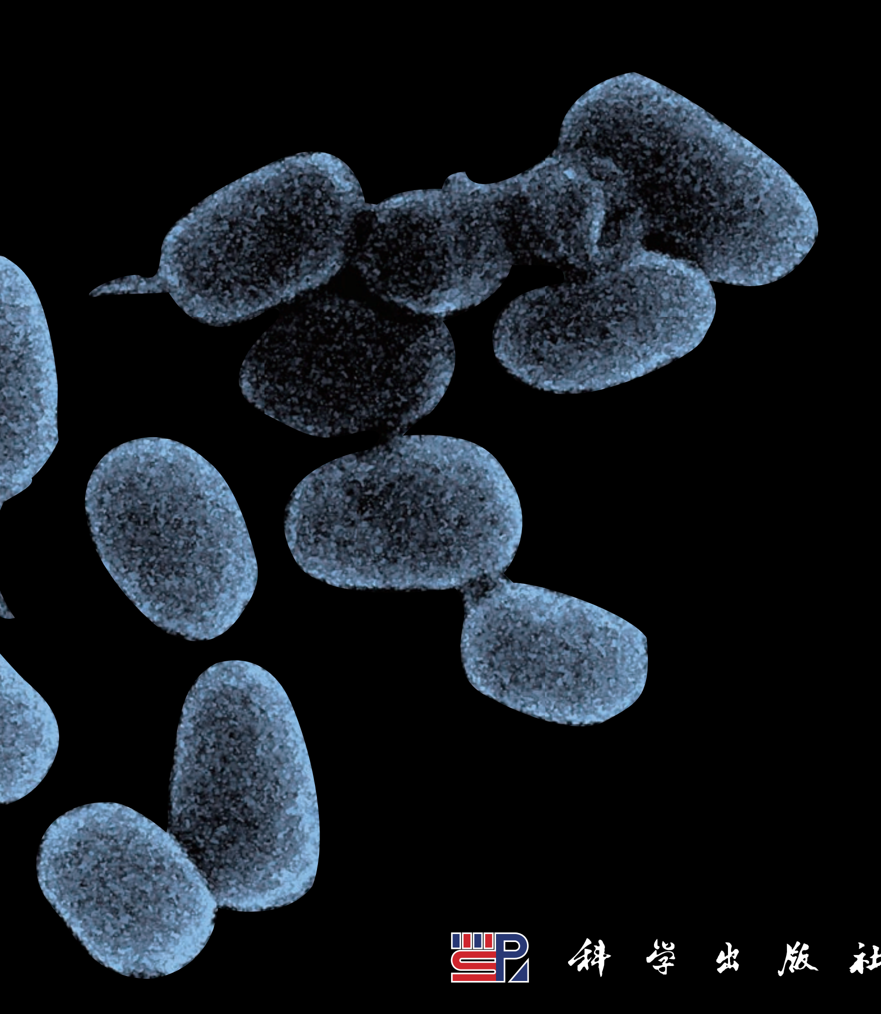
BACILLUS

第三卷

芽胞杆菌生物学

Biology of Bacillus

刘 波 陶天申 车建美
朱育菁 蓝江林 郑雪芳 等 著



科学出版社

芽 胞 杆 菌

第三卷

芽胞杆菌生物学

刘　波　陶天申　车建美
朱育菁　蓝江林　郑雪芳　等　著

科 学 出 版 社
北　京

内 容 简 介

《芽胞杆菌》系列丛书是基于科学研究的专业学术著作。本书是《芽胞杆菌》丛书的第三卷《芽胞杆菌生物学》，全书共分七章。第一章到第三章介绍了芽胞杆菌的生物学、酶学和分子生物学特性，包括形态、生长、营养需要、培养特性、酶学特性、系统发育标记基因、功能基因分析、基因克隆、绿色荧光蛋白基因转导、全基因组测序等。第四章和第五章介绍了芽胞杆菌生态学和植物内生芽胞杆菌多样性，包括种群生长曲线、种群生长竞争、种群空间分布型、群落多样性指数、植物内生芽胞杆菌分布多样性等。第六章和第七章介绍了芽胞杆菌用于生物防治及其作用机理，以植物病虫生防菌、果蔬保鲜菌、动物益生菌、发酵床猪粪降解菌为例子，阐述了植物病害生防菌筛选、定殖、抑病、诱导等作用，解析芽胞杆菌活性功能作用机理，包括了致弱机理、藕合机理、保鲜机理、益生机理、抗病机理、促长机理、降解机理等。全书共列出 1000 多篇文献供参考。

本书可供从事农业、工业、环境、医学、生态等与微生物相关领域的科研人员、企业技术人员、高校教师和研究生等参考。

图书在版编目(CIP)数据

芽胞杆菌. 第 3 卷，芽胞杆菌生物学/刘波等著. —北京：科学出版社，2016.7

ISBN 978-7-03-047414-8

I. ①芽…　II. ①刘…　III. ①芽胞杆菌属-生物学-研究　IV. ①Q939.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 036322 号

责任编辑：李秀伟　郝晨扬/责任校对：郑金红　张怡君

责任印制：肖　兴/封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行　各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第　一　版　　开本：787×1092　1/16

2016 年 7 月第一次印刷　　印张：53 3/4

字数：1 270 000

定价：328.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

BACILLUS

Volume Ⅲ Biology of Bacillus

Edited by
Liu Bo Tao Tianshen Che Jianmei
Zhu Yujing Lan Jianglin Zheng Xuefang

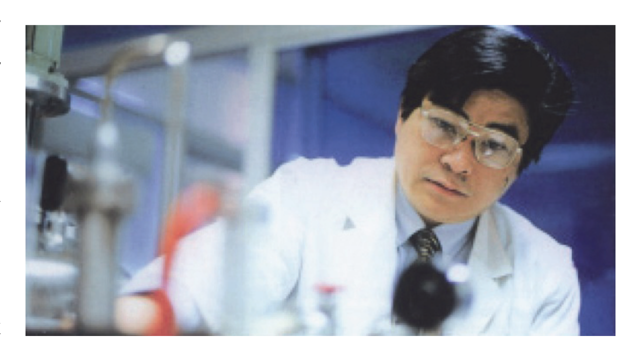
Science Press
Beijing

Summary

BACILLUS is the book series based on scientific studies of the professional academic works. The present book is *BACILLUS*, Vol. Ⅲ *Biology of Bacillus*, Which is divided into seven chapters. The first chapter is biological characteristics of *Bacillus*, including *Bacillus* morphological characteristics, nutritional needs, culture conditions, growth characteristics, physiology and biochemistry, etc. The second chapter is enzymological characteristics of *Bacillus*, including the research progress of *Bacillus* enzyme, enzyme detection method, enzyme production investigation, enzymology characteristics, production characteristics of enzymes e.g. protease, amylase, pectinase, chitinase, xylanase, pullulan, phytase. The third chapter is molecular biological characteristics of *Bacillus*, including the research methods of molecular biology, phylogeny marker genes, functional gene analysis, gene cloning, green fluorescent protein gene transduction, whole genome sequencing. The fourth chapter is ecology characteristics of *Bacillus*, including principle and method of microbial ecology, population growth curve, population growth competition, spatial distribution pattern, population diversity index, species distributions in Xinjiang, Taiwan, Wuyi mountain. The fifth chapter is diversity of endophytic *Bacillus*, including diversity of endophytic *Bacillus* species in grass, eggplant, banana, orange, rice, water hyacinth, selfheal, longan. The sixth chapter is biological control of plant disease using *Bacillus* species, including isolation of *Bacillus* species to control plant diseases, colonization of *Bacillus* species inside plants, soil properties and plant rhizosphere, effects of *Bacillus* species on plant physiological and biochemical characteristics, effect of *Bacillus* species on plant enzyme induction, effect of *Bacillus* species on prevention and control of tomato bacterial wilt, watermelon wilt disease, banana fusarium wilt. The seventh chapter is functional mechanism of *Bacillus* species activity, including attenuation mechanism of *Ralstonia solanacearum*, biological conjugation mechanism of insecticidal toxins, fruit fresh keeping mechanism, mechanism of animals probiotic, biological control mechanism of pig disease in microbial fermentation bed, mechanism of environmental probiotic. There are more than 1000 references cited in the book.

The book is to be referenced in the fields of agriculture, industry, environment, medicine, ecology and other microorganism for scientific personnel in institutes, technical personnel in enterprises, teachers and graduate students in colleges and universities.

作 者 简 介



个人简历：刘波，男，汉族，1957年生，福建惠安人，中共党员。1987年获福建农学院（现福建农林大学）博士学位，1992～1994年在德国波恩大学从事博士后研究，1994～1995年美国密歇根大学短期访问学者，1996～2006年德国波恩大学每年1～3个月短期合作研究访问学者。现任福建省农业科学院院长，二级研究员；农业部科学与技术委员会委员，中国农学会高新技术农业应用专业委员会副理事长，中国植物病理学会常务理事，中国微生物学会理事，福建省科协副主席，福建省农业工程学会理事长，福建省农学会副会长，福建省微生物学会副理事长，福建省生物化学及分子生物学学会副理事长；《中国农业科学》、《农业环境科学学报》、《中国生物防治学报》、《植物保护》、《食品安全质量检测学报》、《生物技术进展》、《亚热带植物科学》等期刊编委；《福建农业学报》、《东南园艺》主编；德国波恩大学植物病理研究所博士生导师，福建农林大学博士生导师，福州大学、福建师范大学硕士生导师，中德生防合作研究、中美柑橘黄龙病合作研究、中以示范农场合作项目等中方首席科学家。

研究经历：长期从事农业微生物生物技术、芽胞杆菌系统发育、农业生物药物（微生物农药、微生物肥料、微生物保鲜、微生物降解、动物益生菌、环境益生菌等）、微生物脂肪酸生态学、微机测报网络、设施农业等研究。主持中德国际合作项目、中美国际合作项目、中以国际合作项目、国家863计划项目、国家自然科学基金、国家科技支撑计划、福建省科技重大攻关项目等科研课题150多个。建立了福建省农业科学院农业微生物创新团队，承担了福建省生物农药工程研究中心（福建省发展和改革委员会，以下简称“发改委”）、福建省农业生物药物工程技术研究中心（福建省科学技术厅，以下简称“科技厅”）、国家外专局国家农业引智技术——生物防治技术推广示范基地、农业部微生物资源与利用重点实验室东南区域农业微生物资源利用科学观测实验站等的建设。以芽胞杆菌的采集、收集、保存、筛选、鉴定、分类、基因等研究为主线，进行农业生物药物（农业微生物制剂）研发，开发生物杀虫菌剂、生物杀菌剂、植物疫苗、饲用益生菌剂、污染物降解菌剂、动物病害生防菌剂、果蔬保鲜剂、植物蛋白乳酸菌发酵剂等。

围绕绿色农业中种植业和养殖业的生物药物研发应用问题，研究用于生猪健康养殖的芽胞杆菌，包括饲用益生菌、猪粪降解菌和猪病抑制菌，建立新型微生物发酵床生猪

养殖体系，饲用益生菌替代抗生素促进猪的生长，猪粪降解菌分解猪粪防止养殖污染和除去养殖臭味，猪病抑制菌接入生猪健康养殖的微生物防治床用于防控猪病，养猪过程采用原位发酵技术，使得猪粪成为优质的微生物肥料。利用养猪生成的微生物肥料，接入防病功能微生物，形成用于植物病害生物防治的生物肥药，如芽胞杆菌防治作物青枯病和枯萎病、淡紫拟青霉防治作物线虫病、木霉防治作物根腐病等土传病害。利用 Tn5 插入方法构建青枯雷尔氏菌无致病力菌株、通过导入尖孢镰刀菌无毒基因构建尖孢镰刀菌无致病力菌株，研制用于植物免疫抗病的植物疫苗，对茄科、瓜类、香蕉等作物进行种苗接种和移栽接种，产生抗病作用，替代化学药剂和补充种苗的嫁接技术。筛选果品采后保鲜和蔬菜种苗保鲜功能芽胞杆菌，进行果蔬采后保鲜和种苗调运中的保鲜，替代化学保鲜剂。筛选乳酸杆菌发酵植物蛋白，研发植物蛋白乳酸菌饮品。农业生物药物的研究从产前、产中、产后环节考虑，为整个绿色农业中的产业链提供系统的农业生物药物（微生物制剂）研制与应用模式，并紧密地结合农业龙头企业，将农业微生物制剂（农业生物药物）的研究成果直接应用于农业生产。

1987～1991 年：1987 年年底博士毕业，1988 年来到福建省农业科学院植物保护研究所，创立了电脑测报研究室；作为生物防治研究的博士，从事害虫天敌的研究，应用昆虫生态知识，设计病虫微机测报网络，研究害虫和天敌的相互关系，达到保护天敌控制害虫的目的。结合留学德国的后续研究，作为第二作者，与德国波恩大学 Sengonca 教授一起，在德国用英文出版了《柑橘粉虱寄生蜂生物学》（ISBN 3-89873-983-X）著作，在昆虫学研究上留下足迹。

1992～1994 年：在德国波恩大学从事博士后研究，起初从事昆虫天敌研究，后来接触到昆虫病理学的研究领域，开始了生物农药——苏云金芽胞杆菌的研究，提出了生物毒素生物藕合技术（bioconjugation technique），利用基团藕联剂（conjugator），将苏云金芽胞杆菌杀虫毒素与阿维菌素毒素进行体外生物藕合，形成单体双毒素结构的 BtA，以拓宽生物农药的杀虫谱和提高杀虫速率，降低害虫抗药性。作为第一作者与德国波恩大学 Sengonca 教授合作，在德国用英文出版了《新型生物农药 BtA 生物藕合技术的研究》（ISBN 3-86537-288-0）著作，进入生物农药研究领域。

1994～2003 年：1994 年从德国回来，随后前往美国作短期访问学者，1995 年从美国返回。1996 年调入福建省农业科学院生物技术中心工作，创立了农业环保技术研究室（Laeptb）。建立了与德国波恩大学植物病理研究所二十多年（1996～2016 年）的合作关系，在国内建立了中德生防合作研究实验室，联合申请到三轮的德国科学基金（Deutsche Forschungemeinschaft，DFG）和德国国际合作基金（Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit，GTZ），并承担了国家自然科学基金、国家 863 计划项目、国家科技支撑计划项目等，在继续研究生物藕合技术的基础上，拓展了生物农药的研究领域，从芽胞杆菌作为生物杀虫剂的研究进入芽胞杆菌作为生物杀菌剂的研究领域，在研究作物青枯病生物杀菌剂——蜡状芽胞杆菌 ANTI 8098A 的过程中，发现了芽胞杆菌对青枯雷尔氏菌的致弱作用，进行了致弱机理和致弱物质的研究，出版了《青枯雷尔氏菌多态性研究》（ISBN 7-5335-2553-1）著作，进入植病生防研究领域。

2004～2007 年：2004 年，福建省农业科学院微生物、动物、植物生物技术三大学科

合并，组建了生物技术研究所，微生物生物技术研究领域成立了生物毒素研究室和生物发酵技术与生物反应器研究室，组合形成生物农药研究中心，承担了福建省生物农药工程研究中心的建设；在原有生物农药研究的基础上，拓展了芽胞杆菌作为饲用益生素的研究，利用绿色荧光蛋白基因标记致病大肠杆菌，通过感染小白鼠和小白鼠服用益生素抗病的相互关系研究，建立益生素作用模型；进行了芽胞杆菌作为化学农药降污菌剂的研究；系统收集芽胞杆菌资源，对其进行保存、鉴定和利用，出版了 380 多万字的《芽胞杆菌文献研究》（ISBN 7-80653-754-6）著作；随着研究的深入，开始了植物免疫特性的研究，进行了青枯雷尔氏菌无致病力菌株免疫抗病特性的研究。与作者的博士后周涵韬博士一起出版了《基因克隆的研究与应用》（ISBN 7-5023-4920-0）、《生化物质分析方法咨询手册》（第一卷 气相色谱法、第二卷 液相色谱法、第三卷 紫外分光光度法）（ISBN 7-5640-0622-6）著作，进入了农业微生物生物技术研究领域。

2008～2010 年：2008 年，根据福建省农业科学院研究所结构的调整，成立了福建省农业科学院农业生物资源研究所，生物农药研究中心改为农业微生物研究中心，转至农业生物资源研究所。2008 年作为福建省农业科学院农业微生物学科的首席专家，组建了院农业微生物学科创新团队，从事微生物基础生物学及农业生物药物的研究与应用。建立了微生物资源的采集、筛选、保存、鉴定、分类平台，组建了微生物形态、生理、生态、分子生物学、基因组学、脂肪酸生态学研究平台，打造了微生物发酵技术、活性物质分析、功能微生物筛选研究平台。注重生物藕合技术、生物致弱机理、免疫抗病机理、植物内生菌、抗病物质分析、脂肪酸生态学、基因组学等研究。开发生物农药、生物肥药、植物疫苗、生物饲料、生物保鲜、生物降污、生物转化等农业生物药物（农业微生物制剂）。这个时期出版了《微生物发酵床零污染养猪技术的研究与应用》（ISBN 978-7-8023-3876-0）、《植物饮品原料研究文献学》（ISBN 978-7-1220-7149-1）等著作。

2011～2014 年：深入研究芽胞杆菌的资源采集、系统分类、生物学、脂肪酸组学、基因组学、物质组学、酶学、发酵工艺学等，研发生物农药、生物肥料、生物保鲜、生物降污、益生菌、生物转化等农业生物药物产品，组建芽胞杆菌生产性工程化实验室。发表了芽胞杆菌新种 9 种，如兵马俑芽胞杆菌（*Bacillus bingmayongensis* DSM 25427^T sp. nov.，Liu et al.，2014）、仙草芽胞杆菌（*Bacillus mesonae* DSM 25968^T sp. nov.，Liu et al.，2014）、慈湖芽胞杆菌（*Bacillus cihuensis* DSM 25969^T sp. nov.，Liu et al.，2014)。这个时期出版了《微生物脂肪酸生态学》（ISBN 978-7-5116-0360-9）（中国农业科学技术出版社）、《农药残留微生物降解技术》（ISBN 978-7-5335-3953-5）（福建科学技术出版社）、《尖孢镰刀菌生物学及其生物防治》（ISBN 978-7-03-038346-4）（科学出版社）等著作。

研究成果：完成了“蚜茧蜂人工大量繁殖技术”、“稻飞虱综合治理”、“数据库自动编程系统”、“水稻病虫微机测报网络”、“生物杀虫剂 BtA 的研究与应用”、“生物杀菌剂 ANTI-8098A 的研究与应用”、“尖孢镰刀菌生物学及其生物防治”、“农业科技推广互联网的建立与应用”、“茶叶病虫系统调控技术的研究”、“微生物发酵床健康养猪技术”、“微生物脂肪酸生态学”、“微生物保鲜技术研究”、“作物病害植物疫苗研究”等课题。在德国博士后工作期间，发明了新型昆虫嗅觉仪，提高了昆虫利

它素的测定精度和效率。研究成果“植物生长调节剂”、“苏云金杆菌培养基”、“气升式发酵生物反应器”、“生物杀虫剂 BtA 的藕合技术”、“微生物发酵床大栏养猪技术”、“微生物保鲜剂”、“植物蛋白乳酸芽胞杆菌饮品”等获国家专利 30 多项。获国家科学技术进步奖二等奖 1 项（参加：生物农药 BtA〈2010〉）；农业部中华农业科技奖一等奖 1 项（主持：重要土传病害生防菌剂创制与应用〈2013〉），福建省科学技术奖二等奖 5 项（主持：水稻病虫微机网络测报技术〈1996〉、高效生物杀虫剂 BtA 的研制与应用〈2006〉、农作物青枯生防菌剂 ANTI-8098A 的研究与应用〈2008〉、无害化养猪微生物发酵床工程化技术研究与应用〈2010〉、龙眼褐变致腐机理及微生物保鲜关键技术的研究与应用〈2011〉）、福建省科学技术奖三等奖 3 项（主持：蚜茧蜂人工大量繁殖技术〈1992〉、计算机管理自动编程系统〈1994〉、农作物线虫生防菌淡紫拟青霉〈2015〉）。获中国青年科技奖（1992）、全国优秀留学回国人员（1996）、福建省省级优秀专家（1997）、福建省“五一”劳动奖章（1999、2010），享受国务院政府特殊津贴（1997），入选国家“百千万”人才第一、二层次管理（1997）和福建省杰出科技人才（2009）。在国内外学术刊物上发表论文 300 多篇，其中 SCI 期刊论文 40 多篇；出版专著 18 本，其中英文专著 2 本。目前，作为中德合作项目、中美合作项目、中以合作项目、国家自然科学基金、国家 863 计划项目、国家科技支撑计划、农业部行业科技专项、国家引智办项目、福建省农业重点项目等的主持人或子项目主持人，从事农业微生物生物技术、芽胞杆菌系统分类、农业生物药物、环保农业技术的研究和应用。

《芽胞杆菌 · 第三卷　芽胞杆菌生物学》

著 者 名 单

（按姓氏汉语拼音排序）

曹　宜	硕士、助理研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
车建美	博士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
陈　峥	博士、助理研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
陈梅春	博士、实习研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
陈倩倩	博士生、实习研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
陈燕萍	硕士、助理研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
葛慈斌	硕士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
黄素芳	副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
蓝江林	博士、研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
林抗美	研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
林营志	博士、副研究员	福建省农业科学院数字农业研究所
刘　波	博士、研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
刘　芸	硕士、助理研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
刘国红	博士、实习研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
潘志针	硕士、实习研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
阮传清	博士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
史　怀	硕士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
苏明星	硕士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
唐建阳	研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
陶天申	教授	武汉大学生命科学学院
王阶平	博士、研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
肖荣凤	硕士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
郑梅霞	硕士、实习研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
郑雪芳	博士、副研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
朱育菁	博士、研究员	福建省农业科学院农业生物资源研究所
Cetin Sengonca	Ph D，Professor	University of Bonn，Germany
Yongping Duan	Ph D，Professor	USDA Horticultural Research Laboratory，Florida，USA

研 究 机 构

1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所
2. 中德生防合作研究实验室（福建省农业科学院/德国波恩大学植物病理研究所）
3. 中美园艺植物病害综合治理合作研究实验室（福建省农业科学院/美国佛罗里达园艺实验室）
4. 国家引进外国智力成果生物防治技术示范推广基地（国家外国专家局）
5. 东南区域农业微生物资源利用科学观测实验站（农业部微生物资源与利用重点实验室）
6. 福建省农业生物药物工程技术研究中心（福建省科技厅）
7. 福建省生物农药工程研究中心（福建省发改委）
8. 芽胞杆菌生产性工程化实验室（福建省农业科学院）
9. 农业微生物创新团队（福建省农业科学院）

资 助 项 目

《芽胞杆菌》得到国家、福建省等部门科技项目的资助，特表衷心感谢。项目如下。

1. 国家自然科学基金项目（2014）——中国芽胞杆菌资源分类及系统发育研究（31370059）
2. 农业部公益性行业（农业）科研专项（2013）——功能性微生物制剂在农业副产物资源化利用中的研究与示范（201303094）
3. 科技部国际合作项目（2012）——规模化养猪污染微生物治理关键技术联合研发（2012DFA31120）
4. 科技部科技支撑计划项目（2012）——规模化养殖场发酵床微生物制剂研究及其废弃物多级循环利用技术的集成示范（2012BAD14B00）
5. 科技部 973 计划前期项目（2011）——芽胞杆菌种质资源多样性及其生态保护功能基础研究（2011CB111607）
6. 农业部 948 重点项目（2011）——高效新型微生物资源引进与创新（2011-G25）
7. 科技部科技支撑计划项目（2008）——热带亚热带外向型农业区新农村建设关键技术集成与示范：闽东南外向型社会主义新农村建设（2008BAD96B07）
8. 自然科学基金项目（2008）——生防菌对青枯雷尔氏菌致弱机理的研究（30871667）
9. 科技部 863 计划项目（2006）——细菌、真菌类生物杀虫剂研究和创制（2006AA10A211）
10. 科技部 863 计划项目（2006）——茄科作物青枯病和枯萎病生防菌剂的研究与应用：芽胞杆菌工程菌的构建及生防菌剂的创制（2006AA10A212）

11. 国家自然科学基金项目（2005）——新型生物杀虫剂 BtA 的藕合机理的研究（30471175）
12. 福建省科技厅科技创新平台建设项目（2007）——福建省农业生物药物研究与应用平台（2007N02010）
13. 福建省发改委农业科技重点项目（2004）——农作物重要毁灭性及检疫性病害枯萎病的流行监控及生物防治技术的研究（闽发改农业[2004]605）
14. 福建省财政厅科技专项（2009）——农业微生物研究中心重大装备建设（2009）
15. 福建省农业科学院科技创新团队项目（2008）——农业微生物基础生物学与农业生物药物的研究与应用（STIF-Y03）

序

拜读了刘波博士等的《芽胞杆菌》即将出版的前三卷：《芽胞杆菌 • 第一卷 中国芽胞杆菌研究进展》、《芽胞杆菌•第二卷 芽胞杆菌分类学》和《芽胞杆菌•第三卷 芽胞杆菌生物学》，十分高兴，这是我国第一部大型系统的芽胞杆菌著作集，必将在推动我国芽胞杆菌研究和应用方面起重要作用。十分遗憾的是，我从事苏云金芽胞杆菌研究和应用 50 年，零散参考过国内外大量芽胞杆菌文献，这三卷著作列举的很多文献我都没见过，如果早期有这样系统的著作参考，我的论文、专利和成果会更丰硕。

1872 年，德国微生物学家科恩（Cohn）根据细菌的形态特征，首次建立了细菌分类系统，第一次命名了芽胞杆菌属（*Bacillus*），将细长精弧菌（*Vibrio subtilis*）重新定名为枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*），并作为芽胞杆菌的模式种，从此芽胞杆菌属种类的数量经历了从少到多，再从多到少，最后从少到多的漫长演变过程。1923～1939 年出版的第一至第五版《伯杰氏鉴定细菌学手册》（*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*）只有一个芽胞杆菌属，1923 年第一版收录了 75 种，1925 年第二版保留了 75 种，1930 年第三版收录了 93 种，1934 年第四版收录了 93 种，1939 年第五版收录了 146 种。而在第六至第八版的《伯杰氏鉴定细菌学手册》中，从芽胞杆菌属中划分出多个芽胞杆菌近缘属，使得芽胞杆菌属中种的数量锐减，1948 年第六版只收录了 33 种，1957 年第七版收录了 25 种，1974 年第八版收录了 22 种。

1984～1986 年，《伯杰氏鉴定细菌学手册》更名为《伯杰氏系统细菌学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*）。1984 年第一版分 4 卷出版，1994 年将原 1～4 卷中有关属以上分类单元进行修改补充后汇集成一册，称为《伯杰氏鉴定细菌学手册》第九版，在该版中形成内芽胞的细菌划分为 35 属，共收录了 409 种，包括 91 个同物异名。2001 年，《伯杰氏系统细菌学手册》第二版分 5 卷出版，收录了 26 个芽胞杆菌属及其近缘属，共 359 种。随着 20 世纪末分子分类法和化学分类法的应用，以及微生物其他研究技术的发展和方法的改进，分类地位的划分更加准确，芽胞杆菌种属中种的鉴定数量越来越多。尽管不同文献收录种的数量有差异，但总趋势是数量增加，如 2005 年出版的《细菌名称确认名录》（*Approved Lists of Bacterial Names*）中，记载了芽胞杆菌属的 175 种，2006 年 NCBI 数据库的芽胞杆菌属中收录了 182 种，2006 年德国微生物菌种保藏中心（DSMZ）收集到芽胞杆菌属中的 171 种，刘波（2006）出版的《芽胞杆菌文献研究》中，收录了芽胞杆菌属的 244 种。

该著作集涉及的芽胞杆菌分类系统，是将“具有命名地位的原核生物名称的名录”网站（List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature，LPSN）中截至 2014 年 12 月底的更新版本，补充到尚未编入《伯杰氏系统细菌学手册》第二版第 3 卷厚壁菌门（Firmicutes）的芽胞杆菌及其近缘属中。在厚壁菌门中包括了芽胞杆菌相关科 5 科

71 属 752 种。

芽胞杆菌在工业、农业、环境、医学等方面的基础研究、应用基础、产业开发和应用中具有极其重要的作用。芽胞杆菌形成的芽胞，具有很强的抗干燥、高温和紫外线，耐盐、碱、酸和重金属的能力，它们能产生多种用途的次生代谢产物，有益产物在工业中用于生产抗生素、酶制剂等，对有害产物中的炭疽毒素、肠毒素等在医学方面进行了许多研究，在环境方面用于有机废弃物和重金属降解、去污等，在农业中广泛用于生物农药、肥料、保鲜剂等产品的生产中。芽胞杆菌与人类关系密切，加之种类多、分布广、抗逆性强、容易培养、遗传操作方便，是进行基因组学等组学基础研究和产物表达的好材料。

我曾经建议刘波博士写一本关于芽胞杆菌的著作，没想到他在科技部、农业部、国家自然科学基金委员会和福建省有关部门的支持下，带领团队致力于芽胞杆菌的研究和应用，取得了一系列的重要成果，相继出版了《芽胞杆菌文献研究》（第一卷、第二卷）、《新型生物农药 BtA 的研发》、*Biotechnological Development of GCSC-BtA as a New Type of Biocide*、《微生物脂肪酸生态学》、《农药残留微生物降解技术》、《尖孢镰刀菌生物学及其生物防治》、《青枯雷尔氏菌多态性研究》等一批著作，充分展现了他的潜心钻研，广阔思路，而且他组织能力十分惊人，科研毅力无可比拟。

《芽胞杆菌•第一卷 中国芽胞杆菌研究进展》共 11 章。第一章简要介绍了细菌的分类系统、芽胞杆菌分类地位和应用，以及中国学者在这方面的研究概况。第二至第十一章分别以芽胞杆菌属、种为单元，介绍了中国学者在脂环酸芽胞杆菌属、兼性芽胞杆菌属、无氧芽胞杆菌属等 10 个芽胞杆菌属及其近缘属中 58 个种的研究进展，包括菌株分离鉴定、生物学特性、代谢产物、发酵技术等，以及在病虫害生物防治、微生物肥料和有机废弃物、农药、重金属等降解与转化方面的应用研究，共列出 8306 篇文献供参考。

《芽胞杆菌•第二卷 芽胞杆菌分类学》共 6 章。第一章阐述了微生物分类学和芽胞杆菌分类学的起源，芽胞杆菌的特征描述等。第二章阐述了芽胞杆菌分类学文献，芽胞杆菌种类命名，芽胞杆菌资源描述规范，芽胞杆菌分类学方法，芽胞杆菌新种发现与发表。第三章阐述了芽胞杆菌分类系统建立，芽胞杆菌分类系统演变，芽胞杆菌分类系统沿革等。第四章阐述了芽胞杆菌传统类群划分，芽胞杆菌经典分类学特性，芽胞杆菌分子分类学特性，芽胞杆菌脂肪酸分类学特性。第五章阐述了基于脂肪酸生物标记芽胞杆菌系统发育，基于全基因组芽胞杆菌属种类系统发育，基于物质组学芽胞杆菌属种类系统发育。第六章阐述了芽胞杆菌 5 科 71 属 752 种，并规范了 752 个芽胞杆菌的中文译名，共列出 896 篇文献供参考。

这次出版的《芽胞杆菌•第三卷 芽胞杆菌生物学》共分 7 章。第一章到第三章介绍了芽胞杆菌的生物学、酶学和分子生物学特性，包括形态、生长、营养需要、培养特性、酶学特性、系统发育标记基因、功能基因分析、基因克隆、绿色荧光蛋白基因转导、全基因组测序等。第四章和第五章介绍了芽胞杆菌生态学和植物内生芽胞杆菌多样性，包括种群生长曲线、种群生长竞争、种群空间分布型、群落多样性指数、植物内生芽胞杆

菌分布多样性等。第六章和第七章介绍了芽胞杆菌用于生物防治及其作用机理，以植物病虫生防菌、果蔬保鲜菌、动物益生菌、发酵床猪粪降解菌为例子，阐述了植物病害生防菌筛选、定殖、抑病、诱导等作用，解析芽胞杆菌活性功能作用机理，包括了致弱机理、藕合机理、保鲜机理、益生机理、抗病机理、促长机理、降解机理等。全书共列出1000 多篇文献供参考。

继《芽胞杆菌》前三卷完稿，得知刘波博士和他的团队还将陆续出版《芽胞杆菌•第四卷 芽胞杆菌脂肪酸组学》、《芽胞杆菌•第五卷 芽胞杆菌物质组学》、《芽胞杆菌•第六卷 芽胞杆菌基因组学》、《芽胞杆菌•第七卷 芽胞杆菌资源学》、《芽胞杆菌•第八卷 芽胞杆菌发酵工艺学》等，期望这些巨著早日问世，为我国微生物学，特别是芽胞杆菌的研究和发展做出重要贡献。

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室

2014 年 11 月 11 日于武昌狮子山

前　言

1872 年，德国微生物学家科恩（Cohn）命名了芽胞杆菌属（*Bacillus*），将枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）作为芽胞杆菌属的模式种。芽胞杆菌的芽胞是休眠体，不是繁殖体，所以芽胞杆菌采用“胞”字而不是用“孢”字。绝大多数是一个菌体细胞仅形成一个芽胞位于菌体细胞内，由核心（core）、皮层（cortex）、芽胞衣（spore coat）和外壁（exosporium）组成。核心又称为芽胞的原生质体，内含 DNA、RNA、保护 DNA 的酸溶性小分子芽胞蛋白，以及合成蛋白质和产生能量的系统。此外，还有大量的吡啶二羧酸（DPA）布满整个芽胞，占芽胞干重的 10%～15%，但一般不存在于不形成芽胞的细菌细胞。DPA 在芽胞中以钙盐的形态存在于内层的细胞膜和外层芽胞衣间的皮层中。皮层处于核心和芽胞衣之间，含有丰富的肽聚糖。芽胞衣主要由蛋白质组成，此外，还有少量的碳水化合物和类脂，可能还有大量的磷。最外层是外壁，其主要成分是蛋白质、一定量的葡萄糖和类脂。由于芽胞具有厚而含水量低的多层结构，因此折光性强、对染料不易着色。芽胞对热、干燥、辐射、化学消毒剂和其他理化因素有较强的抵抗力，这可能与芽胞独具的高含量吡啶二羧酸有关。

芽胞杆菌对外界有害因子抵抗力强，广泛分布于土壤、水、空气、动物肠道、植物体内等处。芽胞杆菌的特性包括：①繁殖快速，代谢快、繁殖快，4h 可增殖 10^6 倍；②生命力强，干燥状态可耐低温–60℃、耐高温 280℃，耐强酸、耐强碱、耐高压、耐高盐、耐高氧（嗜氧繁殖）、耐低氧（厌氧繁殖）、抗紫外线等；③菌体积大，体积比一般病原菌细胞大 4 倍，占据空间优势，抑制有害菌的生长繁殖。

芽胞杆菌与人类关系密切，如炭疽芽胞杆菌引起人、畜的炭疽病；蜡样芽胞杆菌引起食物中毒。对人有利的芽胞杆菌有枯草芽胞杆菌，产生工业或医疗用的蛋白酶、淀粉酶；多黏类芽胞杆菌生产多黏菌素；地衣芽胞杆菌生产杆菌肽；著名的细菌杀虫剂——苏云金芽胞杆菌能杀死 100 多种鳞翅目的农林害虫，现已扩大到杀蚊、蝇、甲虫的幼虫；日本甲虫芽胞杆菌、幼虫芽胞杆菌和缓病芽胞杆菌可用于防治蛴螬等地下害虫。芽胞杆菌分解有机物能力强，在自然界的元素循环中起重要作用。有些种如多黏类芽胞杆菌有固氮的能力。

芽胞杆菌的突出功能包括：①保湿性强，形成强度极为优良的天然材料聚谷氨酸，为土壤的保护膜，防止肥分及水分流失；②分解力强，增殖的同时，会释放出高活性的分解酶，将难分解的大分子物质分解成可利用的小分子物质；③代谢物丰富，合成多种有机酸、酶、生理活性物质等，以及其他多种容易被利用的养分；④抑菌能力强，具有占据空间优势，抑制动植物病原等有害微生物生长繁殖的作用；⑤除臭能力强，可以分解产生恶臭气体的有机物质、有机硫化物、有机氮等，大大改善场所的环境。

芽胞杆菌由于产生芽胞具有较强的抵抗外界环境压力的能力，能够抵抗其生存环境中干燥、高热、高盐、高碱、高酸、高紫外线辐射所造成的伤害，便于工业化生产，被

广泛应用于生物农药、生物肥料、生物保鲜、生物降污、益生菌、酶制剂、生化物质等产品的生产。可应用于：①生物肥料制作，用于发酵有机肥、农家肥、复合肥等；②生物农药生产，如苏云金芽胞杆菌用于防治鳞翅目害虫等；③土壤污染修复剂生产，降解土壤有机废弃物、钝化土壤重金属、降解土壤农药和化肥残留等；④生物保鲜剂生产，利用短短芽胞杆菌制作龙眼果实保鲜剂等；⑤城市垃圾处理，利用芽胞杆菌降解居家垃圾、处理厨余垃圾、净化城市污水等；⑥饲用益生菌生产，制作动物饲料添加剂、水产环境水质净化剂等，如枯草芽胞杆菌可用于畜牧水产饲料添加剂，地衣芽胞杆菌用于水产水环境净化等；⑦生化物质生产，芽胞杆菌可用于酶类如脂肪酶、蛋白酶、植酸酶等生产，用于氨基酸、丁二醇、抗生素等生产。芽胞杆菌各属拥有各自的生物学特性，通过基因选育等生物工程学，可以将自然界的菌种人工选育出特定功能强势的菌种，应用于工农业生产各个方面。在抗生素污染问题越来越严重的今天，有益的芽胞杆菌的应用研究，可能是解决抗生素问题的一个有效方案。

芽胞杆菌分类学发展迅速，1923～1939 年出版的第一至第五版《伯杰氏鉴定细菌学手册》（*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*）中，都将芽胞杆菌归为一个属，即芽胞杆菌属（*Bacillus*），1948～1974 年出版的第六至第八版《伯杰氏鉴定细菌学手册》中，芽胞杆菌出现了近缘属的分化，1984～1986 年，《伯杰氏鉴定细菌学手册》更名为《伯杰氏系统细菌学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*）。第一版《伯杰氏系统细菌学手册》于 1984 年起分 4 卷出版；将芽胞杆菌类细菌分为 35 个属，收录了芽胞杆菌属及其近缘属在内的芽胞杆菌共 409 种，其中有 91 个种是同物异名。第二版《伯杰氏系统细菌学手册》于 2001 年起分 5 卷出版，收录了芽胞杆菌属及其近缘属 26 个、共 359 种芽胞杆菌，这些种中不包括同物异名。随着微生物研究技术、方法的改进和发展，越来越多的芽胞杆菌种类被发现，如 2005 年《细菌名称确认名录》（*Approved Lists of Bacterial Names*）记载的芽胞杆菌种名有 175 个，2006 年 NCBI 数据库上收集的芽胞杆菌属的种名有 182 个，2006 年德国微生物菌种保藏中心（DSMZ）收集的芽胞杆菌属的种名有 171 个，刘波（2006）在出版的《芽胞杆菌文献研究》中，将芽胞杆菌归为一个属（*Bacillus*），共 244 种。本书涉及的芽胞杆菌分类系统，是将“具有命名地位的原核生物名称的名录”网站（List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature，LPSN）中截至 2014 年 12 月底的更新版本，补充到尚未编入《伯杰氏系统细菌学手册》第二版第 3 卷厚壁菌门（Firmicutes）的芽胞杆菌及其近缘属中。因此，在厚壁菌门中包括了传统的芽胞杆菌 5 个相关科，71 个相关属，752 种。

我们研究团队完成了 12 个国家 8500 多份土样采集与保存，分离保存了 28 000 多株芽胞杆菌，收集引进了 260 多个芽胞杆菌标准菌株，启动了芽胞杆菌 62 个属 180 多个种的全基因组测序，开展了芽胞杆菌属 120 多个种的物质组的测定，完成了芽胞杆菌 2800 多个菌株脂肪酸组的测定，实施了芽胞杆菌属 120 多个种 10 种酶的测定，鉴定出芽胞杆菌潜在新种 50 多种（将陆续发表），发表了芽胞杆菌 9 个新种。将逐步出版芽胞杆菌系列专著，包括《芽胞杆菌•第一卷 中国芽胞杆菌研究进展》、《芽胞杆菌•第二卷 芽胞杆菌分类学》、《芽胞杆菌•第三卷 芽胞杆菌生物学》、《芽胞杆菌•第四卷 芽胞杆菌脂肪

酸组学》、《芽胞杆菌·第五卷　芽胞杆菌物质组学》、《芽胞杆菌·第六卷　芽胞杆菌基因组学》、《芽胞杆菌·第七卷　芽胞杆菌资源学》、《芽胞杆菌·第八卷　芽胞杆菌发酵工艺学》等，期望这些著作早日问世，但愿我们多年的科研工作及这些著作能为我国微生物学，特别是芽胞杆菌的研究和应用做出些微贡献。

由于学术水平有限，书中不足之处在所难免，望国内同行批评指正，与之共勉。

著　者

2016 年 1 月 1 日于福州

目　　录

第一章　芽胞杆菌生物学特性

第一节　芽胞杆菌形态特征

一、概述

1. 细菌的形态

细菌（bacteria）是一种个体微小、形态简单、绝大部分有细胞壁、靠二分裂法繁殖的单细胞微生物。在自然界中，细菌分布最广，数量最多。虽然有些细菌给人类带来危害，但更多的细菌是对人类有益的，利用它们能为人类生产出许多食品和其他重要的化工产品。尽管细菌形态简单，细胞大小差异也不大，然而，有些细菌如芽胞杆菌的形态特征和细胞大小是分类学的重要特征，是芽胞杆菌分类单元的实物载体，是研究芽胞杆菌必须描述的内容。根据外形不同，可将细菌分为球菌、杆菌和螺菌三大类。

（1）球菌的形态

球菌（coccus，复数为 cocci）是球状的细菌，根据细胞的分裂面和子细胞分离与否有不同的排列状态，如单球菌[尿素微球菌（*Micrococcus ureae*）]、双球菌[肺炎双球菌（*Diplococcus pneumoniae*）]、链球菌[酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）、四联球菌[四联小球菌（*Micrococcus tetragenus*）]、八叠球菌[藤黄八叠球菌（*Sarcina lutea*）]、葡萄球菌[金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）]（图 1-1）。球菌单个菌体呈球形或近似球形，可将球菌分为双球菌、链球菌和葡萄球菌等。①双球菌。细菌在一个平面上分裂，分裂后每两个菌体成对排列，如肺炎双球菌。②链球菌。细菌在一个平面上分裂，分裂后多个菌体连成链状，如溶血性链球菌（*Streptococcus hemolyticus*）。③四联球菌。细菌在两个相互垂直的平面上分裂，分裂后每 4 个菌体在一起呈田字形，如四联小球菌。④八叠球菌。细菌在 3 个相互垂直的平面上分裂，如甲烷八叠球菌（*Sarcina methanica*）。⑤葡萄球菌。细菌在多个不规则的平面上分裂，分裂后多个菌体不规则地聚集成葡萄串状，如金黄色葡萄球菌。

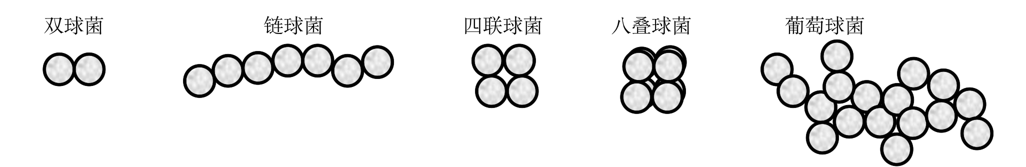


图 1-1　球菌的形态

（2）杆菌的形态

杆状的细菌称为杆菌（bacillus，复数为 bacilli）。杆菌一般呈圆柱形，也有近似卵

圆形的（图 1-2）。短杆菌近似球形，称球杆菌，如芽胞杆菌、布氏杆菌。有的菌体一端或两端膨大，称为棒状杆菌，如化脓棒状杆菌（*Corynebacterium pyogenes*）。有的菌体繁殖时形成侧枝，称为分枝杆菌，如结核分枝杆菌（*Mycobacterium paratuberculosis*）。杆状的细菌形态多样，包括短杆状，如短杆菌或球杆菌［甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*）］；长杆或棒杆状，长宽差别较大，如枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）、北京棒杆菌（*Corynebacterium pekinense*）、白喉棒杆菌（*Corynebacterium diphtheriae*）；梭状，两端稍尖，如鼠疫巴斯德氏菌（*Pasteurella pestis*）；分枝杆状，有分枝，如结核分枝杆菌；平截杆状，两端平截，如炭疽芽胞杆菌（*Bacillus anthraci*）。特殊形状的细菌，菌体分叉，如双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）；菌体末端有柄，如柄杆菌属（*Caulobacter*）；菌体有附器，如臂微菌属（*Ancalomicrobium*）。

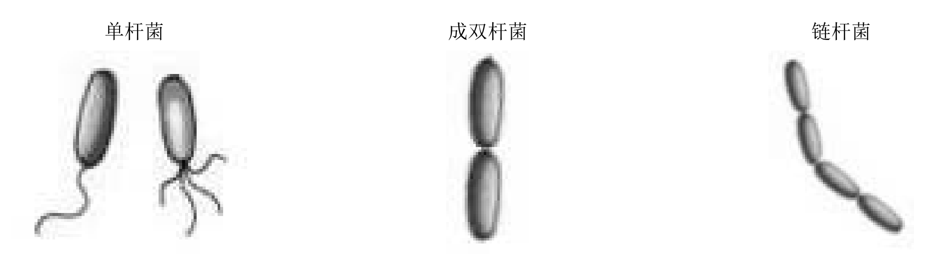


图 1-2　杆菌的形态

（3）螺菌的形态

螺旋状细菌，也称为螺菌（spirillum，复数为 spirilla）。螺旋状的细菌包括弧菌（vibrio），螺旋不到一周，菌体呈弧形或逗点状，如霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）；螺菌，螺旋 1～6 周，为外形坚挺的螺旋状细菌，如红螺菌；螺旋体（spirochaete），螺旋 6 周以上，由原生质柱、轴丝、外鞘组成，为柔软易曲的螺旋状菌体，如钩端螺旋体、梅毒密螺旋体等（图 1-3）。螺形菌菌体呈弯曲状，根据菌体弯曲情况的不同，可分为以下两类：①弧菌。菌体只有一个弯曲，呈弧形或逗点状，如霍乱弧菌。②螺菌。菌体有很多个弯曲，如鼠咬热螺菌。细菌在正常适宜的条件下，具有固定的基本形态，而且保持相对的稳定性。当外界环境条件发生变化时，如培养温度、培养时间、培养基中加入了某些化学药品等，均可导致不规则形态的出现，甚至出现细胞壁有缺陷的细菌。

图 1-3　螺菌的形态

细菌的大小可用测微尺在显微镜下进行测量。细菌的大小不一，球菌直径为 0.5～2μm，杆菌一般长为 1～5μm，宽为 0.5～1μm。螺菌大小差别较大，测量螺菌长度时，

一般只测量其弯曲形长度，而不是测量其真正的总长度。细菌的个体很小，由于细菌种类不同，细菌的大小存在着较大的差异；染色方法不同，同一种类测出的结果往往不一样；细菌细胞的大小常随着菌龄而发生变化，一般幼龄细菌比成熟的或老年的细菌大得多。鉴于以上原因，有关细菌大小的记载，常用平均值或代表性数值表示。单个细菌细胞的质量为 10^{-10}～10^{-9}mg，即每克细菌含 10^{12}～10^{13} 个细菌菌体。例如，大肠杆菌平均长为 2μm，直径为 0.5μm，150 个大肠杆菌细胞头尾相接等于 3mm 长的一粒芝麻，120 个大肠杆菌捆在一起才有一根头发粗细（人发平均直径为 60μm），10^9 个大肠杆菌才有 1mg 重。

2. 细菌的结构

（1）细胞壁

细胞壁厚度因细菌不同而异，一般为15～30nm。主要成分是肽聚糖（peptidoglycan）。肽聚糖是存在于原核生物细胞壁的大分子聚合物，是由乙酰氨基葡萄糖、乙酰胞壁酸与四五个氨基酸短肽聚合而成的多层网状大分子结构。在 *N*-乙酰胞壁酸上接有肽链，不同糖链上的肽链交联后，由 *N*-乙酰葡糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸构成双糖单元，以 β-1,4-糖苷键连接成大分子。*N*-乙酰胞壁酸分子上有四肽侧链，相邻聚糖纤维之间的短肽通过肽桥（G^+ 菌）或肽键（G^-菌）桥接起来，形成了肽聚糖片层，像胶合板一样，粘合成多层。肽聚糖中的多糖链在各物种中都一样，而横向短肽链却有种间差异。细菌细胞壁的功能包括：保持细胞外形，抑制机械和渗透损伤（革兰氏阳性菌的细胞壁能耐受 20kg/cm^2 的压力），介导细胞间相互作用（侵入宿主），防止大分子入侵，协助细胞运动和分裂。脱壁的细胞称为细菌原生质体（bacterial protoplast）或球状体（spheroplast，因脱壁不完全），脱壁后的细菌原生质体，生存和活动能力大大降低。

革兰氏阳性菌细胞壁厚为20～80nm，有15～50层肽聚糖片层，每层厚1nm，含20%～40%的磷壁酸（teichoic acid），有的还具有少量蛋白质。芽胞杆菌细胞壁的组成成分是其种类鉴定的重要特征之一。在芽胞杆菌中，内消旋-二氨基庚二酸（meso-diaminopimelic acid，meso-DAP）是二氨基酸（diamino acid）成分，存在于细胞壁肽聚糖中（peptidoglycan）。主要的呼吸醌包括类异戊二烯醌（predominant isoprenoid quinone）、甲基萘醌-7（menaquinone-7，MK-7 ）等，它们属维生素 K_2 类，含量达 95%以上。

革兰氏阴性菌细胞壁厚约 10nm，仅 2～3 层肽聚糖，其他成分较为复杂，由外向内依次为脂多糖、细菌外膜和脂蛋白。此外，外膜与细胞之间还有间隙。革兰氏阳性菌细胞壁的主要成分是肽聚糖，凡能破坏肽聚糖结构或抑制其合成的物质，都有抑菌或杀菌作用。例如，溶菌酶是 *N*-乙酰胞壁酸酶，可以溶解细胞壁；青霉素抑制转肽酶的活性，从而抑制肽桥的合成。

（2）细胞膜

细胞膜是典型的单位膜结构，厚为 8～10nm，外侧紧贴细胞壁，通常不形成内膜系统，某些革兰氏阴性菌还具有细胞外膜。除核糖体外，没有其他类似真核细胞的细胞器，呼吸和光合作用的电子传递链位于细胞膜上。某些行光合作用的原核生物（蓝细菌和紫细菌），质膜内褶形成结合有色素的内膜，与捕光反应有关。某些革兰氏阳性细菌质膜

内褶形成小管状结构，称为中膜体（mesosome）或间体，中膜体扩大了细胞膜的表面积，提高了代谢效率，有拟线粒体（chondroid）之称，此外还可能与 DNA 的复制有关。

（3）细胞质与核质体

细菌和其他原核生物一样，没有核膜，DNA 集中在细胞质中的低电子密度区，称核区或核质体（nuclear body）。细菌一般具有 1～4 个核质体，多的可达 20 余个。核质体是环状的双链 DNA 分子，所含的遗传信息量可编码 2000～3000 种蛋白质，空间构建十分精简，没有内含子。由于没有核膜，因此 DNA 的复制、RNA 的转录与蛋白质的合成可同时进行，而不像真核细胞那样，这些生化反应在时间和空间上是严格分隔开来的。每个细菌细胞含 5000～50 000 个核糖体，部分附着在细胞膜内侧，大部分游离于细胞质中。细菌核糖体的沉降系数为 70S，由大亚基单位（50S）与小亚基单位（30S）组成，大亚基单位含有 23S rRNA、5S rRNA 与 30 多种蛋白质，小亚基单位含有 16S rRNA 与 20 多种蛋白质。30S 的小亚基单位对四环素与链霉素很敏感，50S 的大亚基单位对红霉素与氯霉素很敏感。位于细菌核区 DNA 以外的、可进行自主复制的遗传因子，称为质粒（plasmid）。质粒是裸露的环状双链 DNA 分子，所含的遗传信息量为 2～200 个基因，能进行自我复制，有时能整合到核 DNA 中。质粒 DNA 在遗传工程研究中很重要，常用作基因重组与基因转移的载体。胞质颗粒是细胞质中的颗粒，起暂时储存营养物质的作用，包括多糖、脂类、多磷酸盐等。

（4）其他结构

许多细菌的最外表还覆盖着一层多糖类物质，边界明显的称为荚膜（capsule），如肺炎球菌；边界不明显的称为黏液层（slime layer），如葡萄球菌。荚膜对细菌的生存具有重要意义。细菌不仅可利用荚膜抵御不良环境，保护自身不受白细胞吞噬，而且能有选择地黏附到特定细胞的表面上，表现出对靶细胞的专一攻击能力。例如，伤寒沙门杆菌能专一性地侵犯肠道淋巴组织。细菌荚膜的纤丝还能把细菌分泌的消化酶储存起来，以备攻击靶细胞之用。鞭毛是某些细菌的运动器官，由一种称为鞭毛蛋白（flagellin）的弹性蛋白构成，结构上不同于真核生物的鞭毛。细菌可以通过调整鞭毛旋转的方向（顺时针和逆时针）来改变运动状态。菌毛是存在于某些细菌表面的一种比鞭毛更细、更短而直硬的丝状物，须用电镜观察。特点是细、短、直、硬、多。菌毛与细菌运动无关，根据形态、结构和功能，可分为普通菌毛和性菌毛两类。前者与细菌吸附和侵染宿主有关，后者为中空管子，与传递遗传物质有关。

3. 细菌革兰氏染色

革兰氏染色法是细菌学中广泛使用的一种鉴别染色法，1884 年由丹麦医师 Gram 创立。未经染色的细菌，由于其与周围环境折光率差别甚小，故在显微镜下极难观察。染色后细菌与环境形成鲜明对比，可以清楚地观察到细菌的形态、排列及某些结构特征，用于分类鉴定。革兰氏染色可以采用复染法，与其他抗菌药物（磷霉素等）联用，如多西环素和多黏菌素联用时，几乎对所有细菌都有协同抗菌作用。根据细菌的革兰氏染色性质，可以缩小鉴定范围，有利于细菌的进一步分离鉴定、对病原做出诊断。又由于各种抗生素的抗菌谱不同，革兰氏染色尚可作为选用抗生素的参考。

细菌的不同显色反应是由于细胞壁对乙醇的通透性和抗脱色能力的差异，主要是由肽聚糖层厚度和结构决定的。经结晶紫染色的细胞用碘液处理后形成不溶性复合物，乙醇能使它溶解，所以染色的前两步结果是一样的，但在 G^+细胞中，乙醇还能使厚的肽聚糖层脱水，导致孔隙变小，由于结晶紫和碘的复合物分子太大，因此不能通过细胞壁，保持紫色。在 G^-细胞中，乙醇处理不但破坏了胞壁外膜，还可能损伤肽聚糖层和细胞质膜，于是被乙醇溶解的结晶紫和碘的复合物从细胞中渗漏出来，当再用衬托的染色液复染时，显现红色。红色染料虽然也能进入已染成紫色的 G^+细胞，但被紫色覆盖，红色显示不出来。

G^+菌细胞壁具有较厚（20～80nm）而致密的肽聚糖层，多达 20 层，占细胞壁成分的 60%～90%，它同细胞膜的外层紧密相连。有的 G^+菌细胞壁中含有磷壁酸，也称胞壁质（murein），它是甘油和核糖醇的聚合物，磷壁酸通常以糖或氨基酸的酯而存在。由于磷壁酸带负电荷，它在细胞表面能调节阳离子浓度。磷壁酸与细胞生长有关，细胞生长中有自溶素（autolysin）酶类起作用，磷壁酸对自溶素有调节功能，阻止胞壁过度降解和壁溶。如果细胞壁的肽聚糖层被消溶，G^+细胞成为原生质体（protoplast），则细胞壁不复存在，而只存留细胞膜。除链球菌外，大多数 G^+菌细胞壁中含极少量蛋白质。

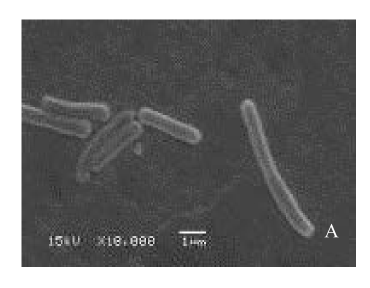
G^-菌细胞壁比 G^+菌细胞壁薄（15～20nm）但结构较复杂，分为外膜（outer membrane）和肽聚糖层（2～3nm）。在细胞壁和细胞质膜之间有一个明显的空间，称为壁膜间隙（periplasmic space）。G^-菌细胞壁外膜的基本成分是脂多糖（lipopolysaccharide，LPS），它同细胞质膜相同之处是双层类脂，但除磷脂外还含有多糖和蛋白质。LPS 的多糖部分包括核心多糖和 *O*-特异多糖。*O*-特异多糖由重复分支的碳水化合物分子组成，含有己糖（葡萄糖、半乳糖和鼠李糖）和二脱氧己糖。由于糖的种类不同，各种 G^-细胞具有不同特性的 LPS。核心多糖（core polysaccharide）的主要组分是酮脱氧辛酸（ketodeoxyoctonate，KDO）。外膜中还含有几种蛋白质，如脂蛋白、通透蛋白。有的蛋白质具有通孔作用，调控外界分子进入细胞；有的蛋白质分子可以作为噬菌体的受体；许多 G^-菌对高等生物有致病性是由 LPS 的成分决定的，它的毒性组分常称为内毒素（endotoxin）。肽聚糖层 G^-菌细胞壁的肽聚糖层很薄，在大肠杆菌和其他细菌中仅有单层。肽聚糖层和外膜的内层之间通过脂蛋白连接起来。壁膜间隙 G^-菌细胞壁的外膜与细胞质膜之间存在明显的壁膜间隙，一层薄的肽聚糖处于其间，肽聚糖层和细胞质膜之间的间隙较宽，肽聚糖层至外膜之间的间隙较窄。大肠杆菌的壁膜间隙宽度为 12～15nm，呈胶胨态。其间含有 3 类蛋白质：水解酶，催化食物的初步降解；结合蛋白，启动物质转运过程；化学受体（chemoreceptor），是在趋化性中起作用的蛋白质。

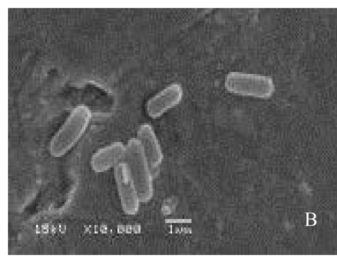
二、芽胞杆菌的细胞形态

1. 芽胞杆菌的菌体形态多态性

芽胞杆菌存在两种形态：芽胞和营养体。营养体的细胞基本形态有杆状和椭圆状。杆状中有长杆状、短杆状；椭圆状中有长椭圆和短椭圆（图 1-4）。不同种类的芽胞杆菌，细胞形态存在一定的差异，细胞的大小为（0.4～1.5）μm×（0.8～3.0）μm，图 1-5

为部分芽胞杆菌的显微镜形态。





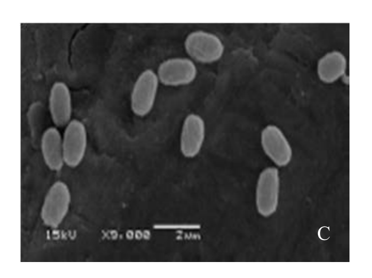
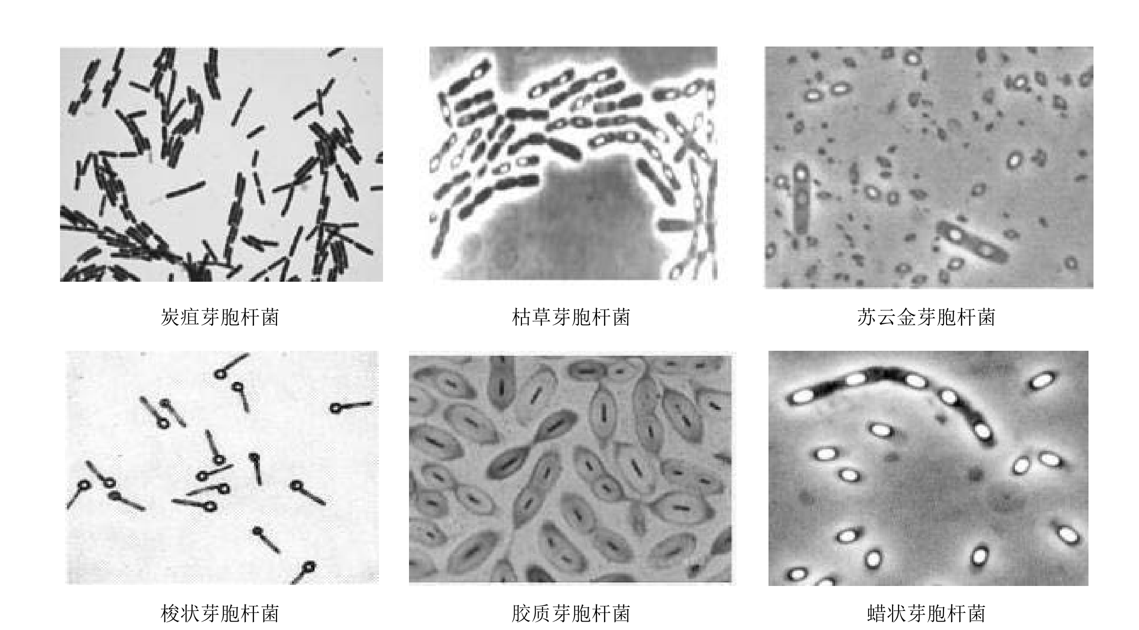


图 1-4　芽胞杆菌细胞形态（一）

A. 长杆状（*B. clausi*）；B.短杆状（*B. firmus*）；C.椭圆状（*B. endophyticus*）



炭疽芽胞杆菌　枯草芽胞杆菌　苏云金芽胞杆菌

梭状芽胞杆菌　胶质芽胞杆菌　蜡状芽胞杆菌

图 1-5　芽胞杆菌细胞形态（二）

2. 芽胞杆菌的细胞分裂

芽胞杆菌属于原核生物。原核细胞和真核细胞的细胞分裂方式有很大的不同，原核细胞的分裂方式简单，细胞周期短，在适宜条件下可大量繁殖（如细菌每 20min 就可分裂一次），其分裂方式为一分二或二分裂，习惯上又称无丝分裂或直接分裂。蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*） ANTI-8098A 营养体以二分裂的方式生长，一个细胞横裂为两个细胞，两个细胞分裂为四个，以至往复循环。在菌体细胞分裂后，常常连体成长链，可见单联体、二联体、三联体、四联体、五联体、六联体、多联体细胞状态（图 1-6）。

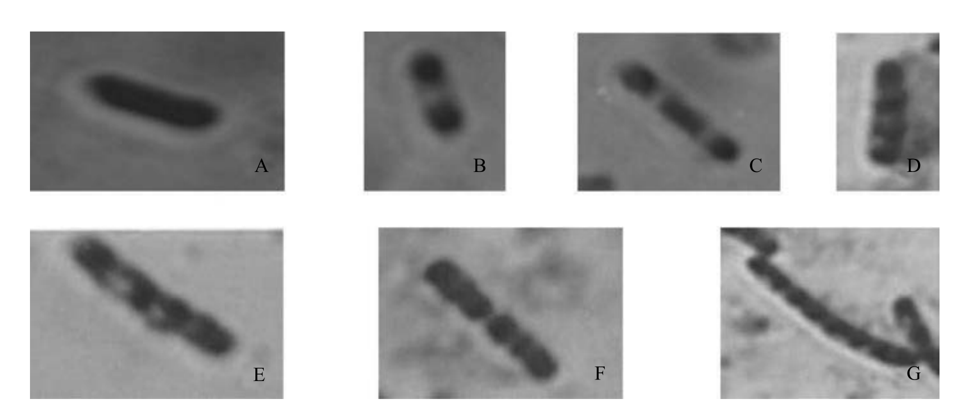


图 1-6　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 细胞联体和菌落形态

A.单细胞；B.二联体；C.三联体；D.四联体；E.五联体；F.六联体；G.多联体

3. 芽胞杆菌细胞多联体与发酵水平相关性

芽胞杆菌细胞多联体的产生与其营养利用有关，如蜡状芽胞杆菌多联体产生多的时候，表明菌体生长所需的营养下降，菌体生长将受到限制。在发酵过程中，当多联体比例为 23.0%时，菌体数较少，为 19×10^8CFU/ml；当多联体比例为 7.8%时，菌体数较多，为 45×10^8CFU/ml，当多联体比例为 2.6%时，菌体数最多，为 67×10^8CFU/ml（表 1-1）。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的发酵终点菌体数与四联体以上多联体的菌体比例成反比，即发酵液中多联体比例越高，菌体数越低。发酵终点菌体数（y）与四联体以上多联体的菌体比例（x）的预测方程为 $y = -1.6721x + 61.007$，相关系数平方为 $R^2 = 0.9027$（图 1-7）。多联体现象的出现，表明了发酵液的营养不能满足菌株生长的要求，细胞分裂的时间拉长，前一个细胞分裂尚未分离，后一个细胞开始分裂，形成了多联体。发酵液中多联体的比例作为镜检该菌株发酵过程生长状态的一个指标，十分有效。

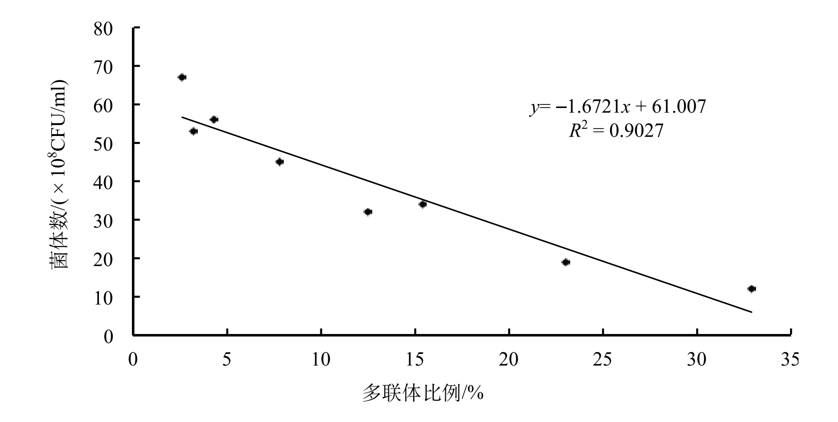


图 1-7　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 多联体比例

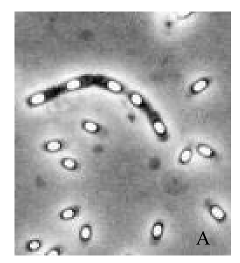
表 1-1　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 发酵终点菌体数与多联体比例的关系

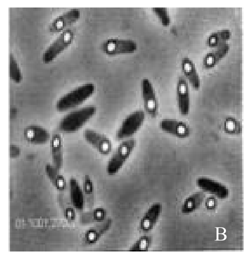
发酵批次	菌体数/（$\times 10^8$ CFU/ml）	多联体比例/%
1	67	2.6
2	53	3.2
3	56	4.3
4	45	7.8
5	32	12.5
6	34	15.4
7	19	23.0
8	12	32.9

三、芽胞杆菌的芽胞特性

1. 芽胞的定义

芽胞是指芽胞杆菌在一定条件下，细胞质高度浓缩脱水所形成的一种抗逆性很强的球形或椭圆形的休眠体。芽胞杆菌的一个细胞只形成一个芽胞，有的在细胞一端，有的在细胞中部。由于芽胞是在细胞内形成的，因此也常称为内生芽胞，也称芽胞。芽胞不是繁殖器官（图 1-8）。





C

图 1-8　芽胞杆菌芽胞形态

A. 枯草芽胞杆菌；B.球形赖氨酸芽胞杆菌；C.蜡状芽胞杆菌

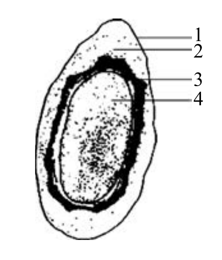


图 1-9　芽胞结构模式图

1. 原细胞壁；2. 残留细胞质；3. 芽胞壁；4. 芽胞细胞质

2. 芽胞的结构

芽胞的结构相当复杂，最里面为核芯（core），含原生质体，被芽胞膜（spore membrane）所包裹。核芯外面为皮层（cortex），成分为肽聚糖，再往外是由一层或数层蛋白质组成的芽胞壳（spore coat），最表面为芽胞壁（spore wall），也称芽胞外壁（exosporium）（图 1-9）。

3. 芽胞的类型

芽胞一般呈圆形、椭圆形、圆柱形。在有些细菌中，芽胞的直径小于菌体直径，这些细菌称为芽胞杆菌，主要为好氧细菌；在另一些细菌中，芽胞的直径大于菌体直径，

使整个菌体呈梭形或鼓塑形，这些细菌称为梭状芽胞杆菌，主要为厌氧菌。梭状芽胞杆菌的芽胞位于菌体中间，破伤风杆菌的芽胞位于菌体的一端，使菌体呈鼓槌状(图1-10)。好氧的芽胞杆菌属（*Bacillus*）和厌氧的梭菌属（*Clostridium*）的细胞都具有芽胞。在球菌和弧菌中，只有少数种类有芽胞，球菌中只有芽胞八叠菌属（*Sporosarcina*）产芽胞，弧菌中只有芽胞弧菌属（*Sporovibrio*）产芽胞。

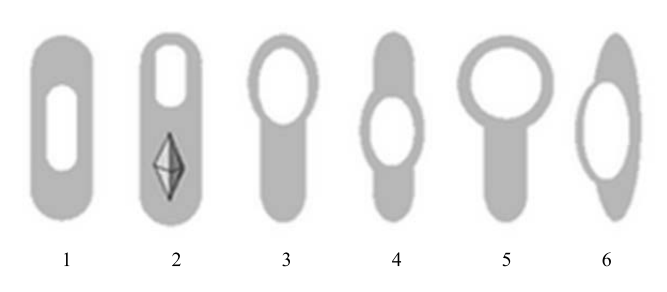


图1-10　芽胞的变异形态

4. 芽胞的形成

芽胞的形成是一个极其复杂的过程，包括形态结构、化学成分等多方面的变化。芽胞的形成在结构上主要经历以下几个阶段：①核物质融合成轴丝状（杆状）；②在细胞中央或一端，细胞膜内陷形成隔膜包围核物质，产生一个小细胞；③小细胞被原来的细胞膜包围，生成前芽胞；④前芽胞再被多层膜包围，如皮层、芽胞衣等，最后成为成熟的芽胞，由于细胞壁的破溶而释放出来（图1-11）。芽胞形成过程中在化学成分方面也发生很大变化。生芽胞的细胞大量吸收钙离子并大量合成营养细胞中没有的吡啶二羧酸。在成熟的芽胞中，芽胞原生质体含有极高的吡啶二羧酸钙，在新合成的、具有特殊化学构造的外皮层和芽胞衣（有时还有芽胞外壁）中也有这种物质。芽胞的壁含有一种特殊的肽聚糖，所有芽胞基本上都一样，但与营养细胞的细胞壁肽聚糖不一样。同时，芽胞中还含有一些特殊的蛋白质。

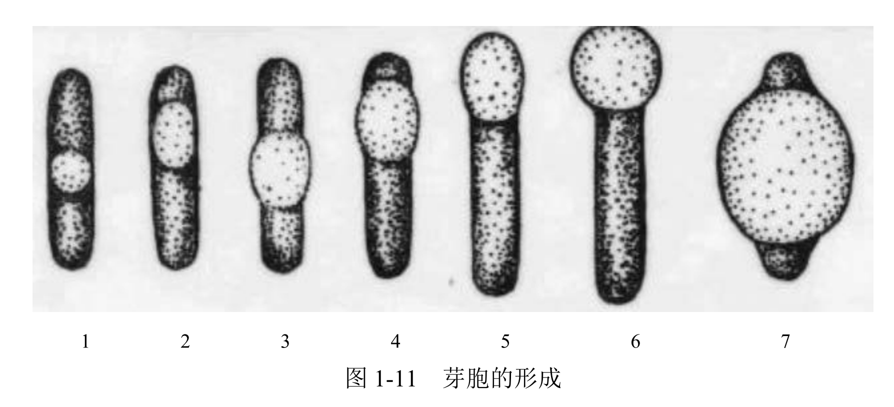


图1-11　芽胞的形成

5. 芽胞的特性

由于芽胞在结构和化学成分上均有别于营养细胞，因此，芽胞也就具有了许多不同

于营养细胞的特性。芽胞最主要的特点就是抗性强，对高温、紫外线、干燥、电离辐射，以及很多有毒的化学物质都有很强的抗性。同时，芽胞还有很强的折光性。在显微镜下观察染色的芽胞细菌涂片时，可以很容易地将芽胞与营养细胞区别开，因为营养细胞染上了颜色，而芽胞因抗染料且折光性强，表现出透明而无色的外观。研究表明，芽胞对不良环境因子的抗性主要由于其含水量低（40%），且含有耐热的小分子酶类，富含大量特殊的吡啶二羧酸钙和带有二硫键的蛋白质，以及具有多层次、厚而致密的芽胞壁等原因。自由存在的芽胞没有明显的代谢作用，只保持潜在的萌发力，称为隐藏的生命。一旦环境条件合适，芽胞便可以萌发成营养细胞。

6. 芽胞的作用

不同细菌的芽胞具有不同的特点，从形状、大小、表面特征，直到与菌体的关系等都有不同的表现，因此可以作为分类鉴定的依据或参考。由于其独特的产生方式，芽胞成为研究形态发生和遗传控制的好材料。保存菌种芽胞对不良环境有很强的抵抗力，可以保持生命力达数十年，在自然界使细菌度过恶劣的环境，是在实验室保存菌种的好材料。分离菌种芽胞的耐热性有助于芽胞细菌的分离。

7. 芽胞的危害

芽胞对人类也有有害的一面。因为有些能形成芽胞的细菌是人体的病原菌，在食品、医药及发酵工业等领域存在难以彻底消灭细菌的芽胞，形成污染。最常见的情况之一，就是用加热法保存食品时，芽胞往往无法灭活，会造成食品保存的失败。这是因为芽胞极耐热，一般加热法不能把它杀死，它萌发成营养细胞后会大量繁殖，导致食品腐败变质。因此需要用高压高温灭菌法（121℃，30min）将芽胞杀死，才能使食品长期保存。医疗器械也需经高温灭菌后才能保证安全。近几年发展起来的辐射灭菌法，其主要杀灭对象也是芽胞。

四、芽胞杆菌的伴胞晶体

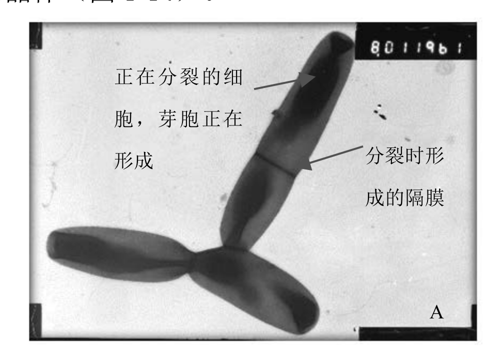
1. 伴胞晶体

伴胞晶体（parasporal crystal）是少数芽胞杆菌，如苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*，Bt）在其形成芽胞的同时，会在芽胞旁形成一颗菱形或双锥形的碱溶性蛋白晶体——δ内毒素，也称为伴胞晶体（邵宗泽等，2002）。其特点为不溶于水，对蛋白酶类不敏感，容易溶于碱性溶剂。伴胞晶体对 200 多种昆虫尤其是鳞翅目的幼虫有毒杀作用，因而可将这类产伴胞晶体的细菌制成有利于环境保护的生物农药——细菌杀虫剂。自 20 世纪初被发现以来，世界各国又相继从昆虫体内或土壤中分离出该种细菌，全世界收集保藏的 Bt 已达 4 万株，在害虫的防治中发挥了巨大的作用，是近年来发展最快、应用最广的微生物杀虫剂（Agaisse and Lerechus，1995）。苏云金芽胞杆菌 Bt LSZ-9408（*B. thuringiensis* subsp. *kurstakii*）是福建省农业科学院农业生物资源研究所分离的、对多种鳞翅目昆虫具有高毒力的 Bt 菌株，有较大的应用潜力（Zhu *et al.*，2005）。

大多数 Bt 菌株都能产生多种类型的晶体蛋白，不同亚种，甚至同一亚种不同菌株，杀虫晶体蛋白的多肽成分都不同，杀虫蛋白晶体由多种蛋白多肽组成，这些蛋白多肽在不同类型杀虫蛋白中以不同方式结合而构建蛋白晶体。CryⅠ、CryⅣA 和 CryⅣB 蛋白的 C 端区域结构相似，富含半胱氨酸，蛋白多肽之间通过二硫键能自我积聚，形成稳定的晶体结构，这类伴胞晶体需要一个更严格的理化条件才能形成一个可溶和具有活性的杀虫蛋白。CryⅢA 蛋白由于其 C 端区域并不富含半胱氨酸，组成蛋白晶体的蛋白多肽之间并不是由二硫键相连，而是盐桥作用构成的伴胞晶体。71kDa 的 CryⅡA 蛋白、72kDa 的 CryⅣD 蛋白和 27kDa 的 CytA 蛋白晶体形成和稳定，需要其他多种辅助蛋白（P19、P20、orf1、orf2）存在，表现出苏云金芽胞杆菌杀虫蛋白晶体形成的多样性。由于杀虫晶体蛋白这些组成上的差异，其溶解性也是多种多样。

2. 伴胞晶体的形成

Bt 菌株 HD-1 菌体为短杆状，细胞分裂时形成隔膜，隔膜的形成启动了芽胞和晶体的形成，隔膜中间向母细胞一端凸出形成脊，后隔膜两侧向端部移动，两边速度不一样，形成亚极型前芽胞，最后连接，前芽胞形成（图 1-12）。芽胞形成于远离隔膜的一端，晶体形成在隔膜的一端。芽胞和晶体在成熟后从细胞中脱离，晶体为菱形，芽胞为椭圆形，外带有芽胞衣（图 1-13）。Bt 菌株 HD-1 在分裂过程中的晶体为大菱形。前期的预备试验还发现 Bt LSZ-9408 晶体形态多种，除有菱形晶体外，还带有不同大小的小方形的晶体（图 1-14）。



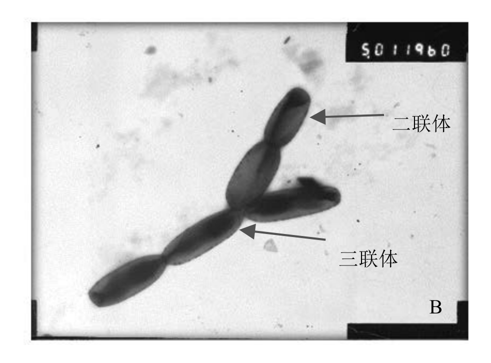


图 1-12　芽胞杆菌的细胞分裂

A. 正在分裂的细胞，形成隔膜，而后形成前芽胞，对称分裂和不对称分裂；B. 二联体和三联体

3. 伴胞晶体的成分

大量的研究发现，有些 Bt 菌株能产生多分子质量的复合蛋白。毒蛋白的分子质量一般为 125～138kDa、65～75kDa 或 25～28kDa。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）结果表明，Bt LSZ-9408 晶体含有 130kDa 和 65kDa 的毒蛋白，HD-1 晶体含有 130kDa、65kDa 和 25kDa 的毒蛋白。采用含 5% β-巯基乙醇的 50mmol/L Na_2CO_3·HCl（pH9.5）处理伴胞晶体，Bt LSZ-9408 的 65kDa 的蛋白质溶解，而 Bt 菌株 HD-1 的 130kDa 的蛋白质溶解。其他的溶解处理和激活处理未出现条带，可能与电泳样品的浓度不足相关，需进行进一步的试验。

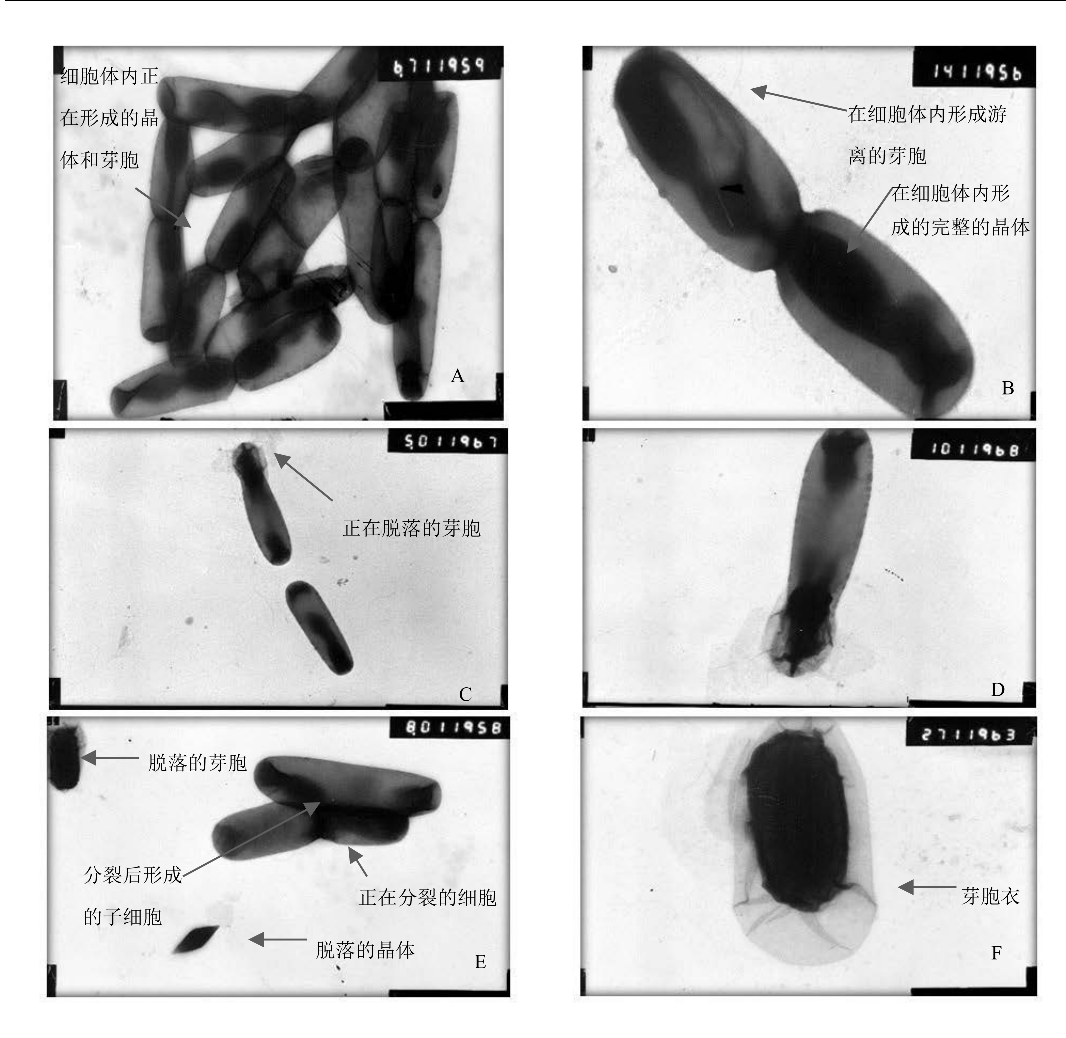


图 1-13　芽胞形成

A. 细胞体内正在形成的晶体和芽胞；B. 细胞体内形成的成熟的晶体和芽胞；C、D. 正在脱落的芽胞；E. 已脱落的芽胞和晶体；F. 芽胞衣，芽胞外有一层纤维状的芽胞衣

Lereclus 等（1993）将苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 图谱分为 5 类：第一类含 CryⅠ和 CryⅡ，分子质量为 130～140kDa 和 67kDa；第二类仅含 CryⅠ，分子质量为 130～140kDa；第三类仅含 Cry Ⅲ，分子质量为 67kDa；第四类为 CryⅣ，分子质量为 130kDa、67kDa 和 27kDa；第五类则仅含分子质量为 40～45kDa 的杀虫晶体蛋白，各类都表现出不同的杀虫活性谱。并且 CryⅠ蛋白一般在 pH9.5 条件下溶解，CryⅡ则要求 pH 约为 12 才能完全溶解。研究结果表明，Bt LSZ-9408 和 HD-1 都包含 CryⅠ和 CryⅡ蛋白。Bt HD-1 的结果与张宏宇等（2000）的相同，他们报道 HD-1 的晶体蛋白组成为 CryⅠA(a) 28%、CryⅠA(b) 39%、CryⅠA(c) 33%，却发现多了一条在 25kDa 左右的蛋白质条带。同时这两种菌株的 CryⅠ蛋白都在 pH 9.5 条件下溶解。由于细胞产生的蛋白水解酶总是黏附于伴胞晶体，杀虫晶体蛋白在制样过程中往往产生不同程度的酶解，而并

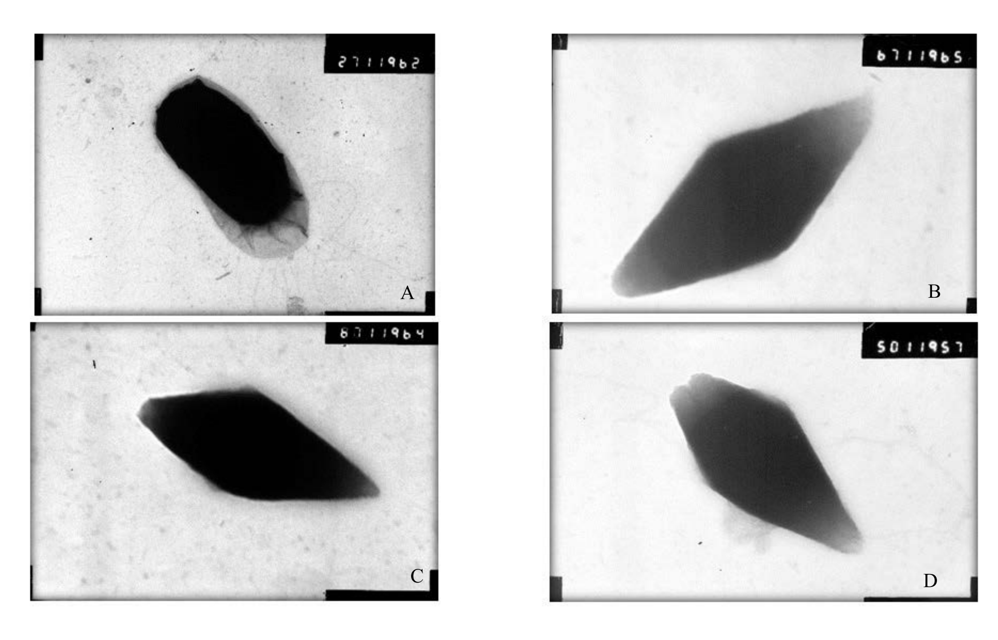


图 1-14　培养 24h 的 Bt 菌株 HD-1 的透射电镜观察

A. 芽胞；B. 菱形晶体；C. 菱形晶体；D. 一端带缺口的菱形晶体

未完全准确反映多肽的实际分子质量（张松鹏等，2002）。研究结果也发现除了主要条带外，还有其他非主要条带的产生，可能与酶解有关。为了对苏云金芽胞杆菌杀虫蛋白晶体的多肽组成有一个更清晰、更准确的认识，目前常用的方法是对杀虫晶体蛋白基因的克隆，已被克隆和序列化的 116 个杀虫晶体蛋白基因表达的蛋白质产物，分子质量为 27～140kDa（李长友等，2004）。因此会进一步对这两种 Bt 菌株的杀虫晶体蛋白基因进行克隆。

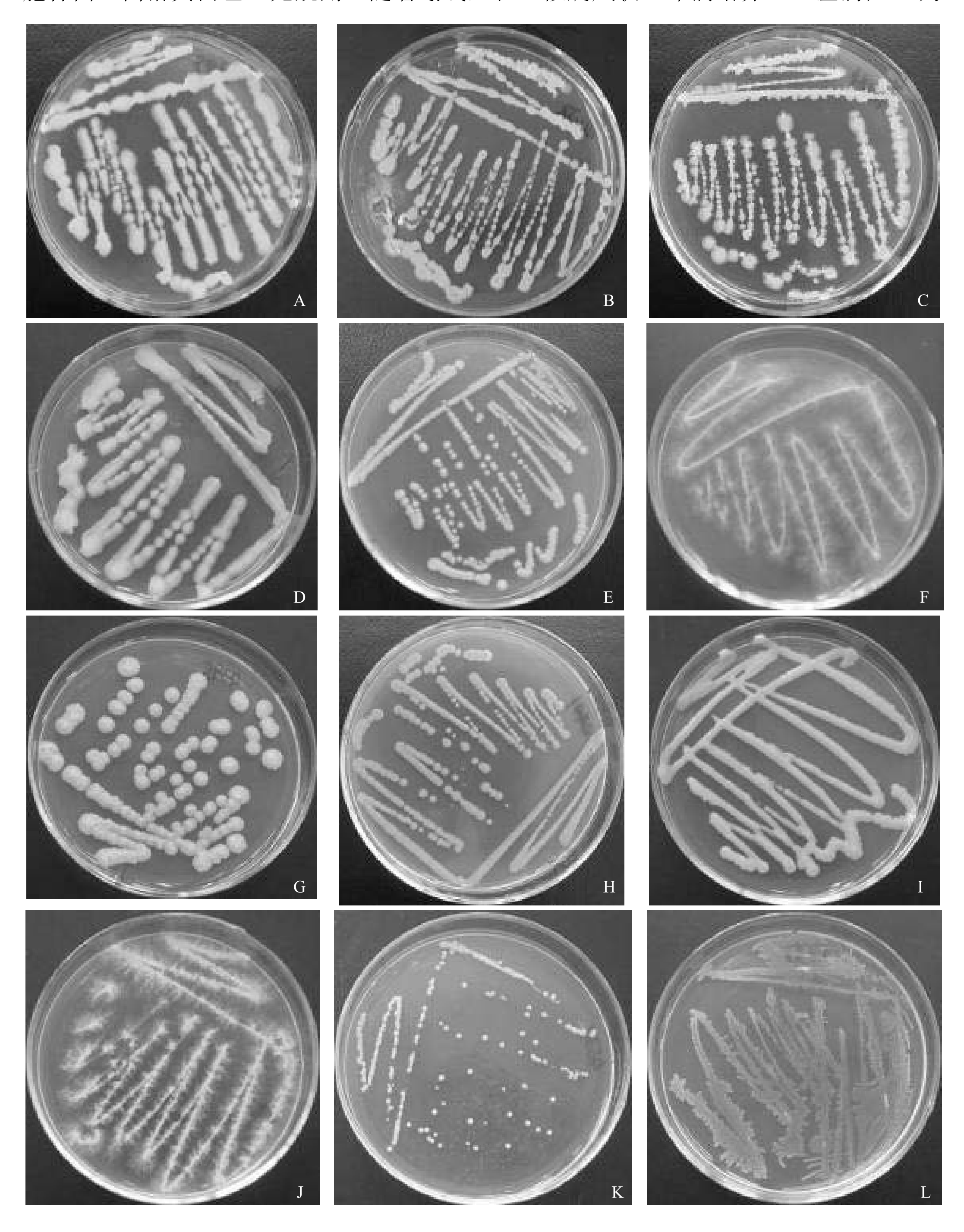
五、芽胞杆菌的菌落形态

1. 芽胞杆菌菌落的一般特征

芽胞杆菌菌落特征是种的一个重要指标，从以下几个方面描述芽胞杆菌菌落特征，特定培养条件下的菌落大小、单菌落形状、表面颜色、表面特性、表面光滑度、边缘整齐度等。例如，枯草芽胞杆菌在锰营养琼脂平板上 37℃培养 36h 形成的菌落为圆形，直径 3.0～10.0mm，淡黄色，中间色深，表面平整不光滑，无光泽，边缘不整齐。

同一种芽胞杆菌的不同菌株，表现出的菌落特征存在差异。图 1-15 展示了芽胞杆菌菌落的一般特征，其中 A 为 *B. atrophaeus* FJAT-4399（深褐芽胞杆菌），白色，背面淡黄色，圆形或不规则，不透明，表面有一层膜，无光泽；B 为 *B. atrophaeus* FJAT-4403，暗白色，背面橙色，表面有一层膜状物，有褶皱，干燥，无光泽；C 为 *B. atrophaeus* FJAT-4404，白色，背面淡黄色，表面有一层膜状物，有褶皱，干燥，无光泽，边缘不整齐；D 为 *B. atrophaeus* FJAT-4580，白色，圆形，表层有膜状物，有光泽，具有流动性，边缘透明；E 为 *B. licheniformis* FJAT-4415（地衣芽胞杆菌），圆形，突起，有光泽，中间有小凸起；F 为 *B. cereus* FJAT-4679（蜡状芽胞杆菌），白色或培养基颜色，根状，

扁平，紧贴培养基，不易挑取；G 为 *B. megatherium* FJAT-4395（巨大芽胞杆菌），菌落大，乳白色，圆形，突起，菌落紧缩在一起，有褶皱，有光泽；H 为 *B. megatherium* FJAT-4401，橙色，圆形，突起，湿润，有光泽，周边透明；I 为 *B. megatherium* FJAT-4503，菌落大，乳白色，突起，有光泽，周边透明，具有流动性；J 为 *B. mycoides* FJAT-4749（蕈状芽胞杆菌）菌落黄白色，无规则，随着划线生长，似旋风状，布满培养皿，湿润；K 为



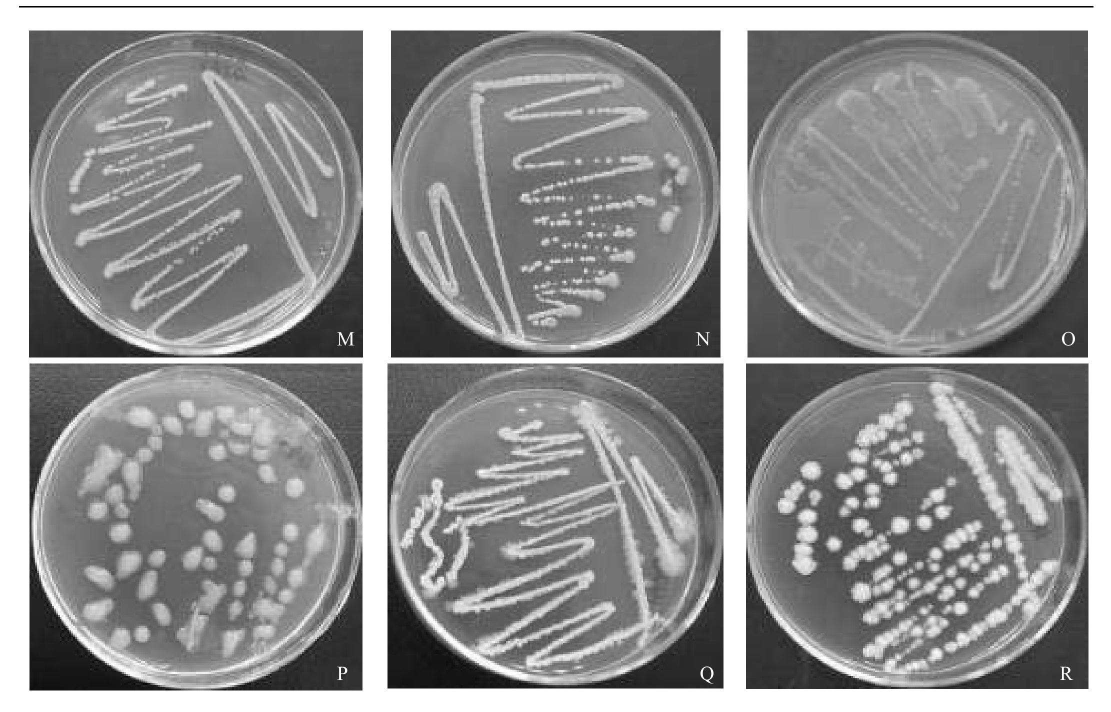


图 1-15　芽胞杆菌菌落形态

A. *B. atrophaeus* FJAT-4399; B. *B. atrophaeus* FJAT-4403; C. *B. atrophaeus* FJAT-4404; D. *B. atrophaeus* FJAT-4580; E. *B. licheniformis* FJAT-4415；F. *B. cereus* FJAT-4679；G. *B. megatherium* FJAT-4395；H. *B. megatherium* FJAT-4401；I. *B. megatherium* FJAT-4503；J. *B. mycoides* FJAT-4749；K. *Paenibacillus polymyxa* FJAT-4537；L. *P. polymyxa* FJAT-4567; M. *B. pumilus* FJAT-4563; N. *B. simplex* FJAT-4393; O. *L. sphaericus* FJAT-4751; P. *B. subtilis* FJAT-4410；Q. *B. subtilis* FJAT-4428；R. *B. subtilis* FJAT-4475

Paenibacillus polymyxa FJAT- 4537（多粘类芽胞杆菌），菌落米粒大小，黄白色，突起，紧贴培养基，无光泽，边缘整齐；L 为 *P. polymyxa* FJAT-4567，菌落小，连成一片，培养基颜色，无光泽，边缘整齐；M 为 *B. pumilus* FJAT-4563（短小芽胞杆菌），菌落小，黄色，圆形，隆突，有光泽；N 为 *B. simplex* FJAT-4393（简单芽胞杆菌），培养基颜色，圆形，突起，有光泽，半透明，中间有凹窝；O 为 *L. sphaericus* FJAT-4751（球形赖氨酸芽胞杆菌），菌落小，浅黄绿色，圆形，有时呈片状，光滑，有光泽；P 为 *B. subtilis* FJAT-4410，菌落黄白色，圆形，突起，光滑，有光泽，似透明，边缘有透明圈；Q 为 *B. subtilis* FJAT-4428，白色，枯草状，扁平，表面粗糙有一层膜状物，有褶皱，无光泽，不透明，中间凹陷；R 为 *B. subtilis* FJAT-4475，白色，圆形或不规则，枯草状，扁平，表面有一层膜，有褶皱，无光泽，不透明，中间有一“小亮球”。

2. 不同培养基芽胞杆菌的菌落变化

芽胞杆菌属于耗氧、兼性耗氧的细菌，最近也发现了厌氧的类群，如厌氧芽胞杆菌（*Anaerbacillus alkalidiazotrophicus*）。芽胞杆菌能耐酸、耐碱、耐盐、耐压、耐高温、

耐低温等。芽胞杆菌能产生丰富的酶类，如淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、漆酶、脂肪酶、溶菌酶、普鲁兰酶、几丁质酶等。芽胞杆菌属种类间的菌落形态特征多样性丰富，很多种间的亲缘关系很近，但菌落形态和化学特征差异很大。选取芽胞杆菌模式菌株为研究对象，观察不同培养基上同种芽胞杆菌菌落形态特征的变化，选取芽胞杆菌的代表性模式菌株见表 1-2。选用 5 种培养基，进行芽胞杆菌的培养，培养基信息见表 1-3。试验方法，将供试芽胞杆菌在培养基如 TSBA、NA、LB、NACL 和 GLU 上接菌，30℃培养 24h，观察不同培养基上芽胞杆菌的形态变化，利用佳能相机记录菌落形态特征。

表 1-2　供试菌株信息

序号	菌株库存编号	菌株原始编号	种名	中文名称
1	FJAT-8754	CCUG 28519	*B. amyloliquefaciens*	解淀粉芽胞杆菌
2	FJAT-8755	CCUG 28524	*B. atrophaeus*	深褐芽胞杆菌
3	FJAT-8771	CCUG 7422	*B. licheniformis*	地衣芽胞杆菌
4	FJAT-10005	DSM 9205	*B. mojavensis*	莫哈维芽胞杆菌
5	FJAT-14251	DSM 22148	*B. subtilis* subsp. *inaquosorum*	枯草芽胞杆菌因氏亚种
6	FJAT-14250	DSM 15029	*B. subtilis* subsp. *spizizenii*	枯草芽胞杆菌 *spizizenii* 亚种
7	FJAT-14254	DSM 10	*B. subtilis* subsp. *subtilis*	枯草芽胞杆菌枯草亚种
8	FJAT-14256	DSM 13779	*B. sonorensis*	索诺拉沙漠芽胞杆菌
9	FJAT-2295	DSM 30646	*B. simplex*	简单芽胞杆菌
10	FJAT-8774	CCUG 1817	*B. megatherium*	巨大芽胞杆菌
11	FJAT-14	FJAT-14	*B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌
12	FJAT-8760	CCUG 7414	*B. cereus*	蜡状芽胞杆菌
13	FJAT-8775	DSM 2408	*B. mycoides*	蕈状芽胞杆菌
14	FJAT-14225	DSM 12442	*B. pseudomycoides*	假蕈状芽胞杆菌
15	FJAT-9	FJAT-9	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌
16	FJAT-8766	CCUG 28888	*L. fusiformis*	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌
17	FJAT-14201	DSM 18869	*L. odysseyi*	奥德赛赖氨酸芽胞杆菌

表 1-3　芽胞杆菌培养的培养基种类信息

序号	培养基名称	缩写	培养基组成
1	营养琼脂培养基	NA	3g/L 牛肉膏、10g/L 蛋白胨、3.5g/L 琼脂，pH7.0
2	葡萄糖琼脂培养基	GLU	3g/L 牛肉膏、10g/L 蛋白胨、10g/L 葡萄糖、3.5g/L 琼脂，pH7.0
3	含盐琼脂培养基	NACL	3g/L 牛肉膏、10g/L 蛋白胨、5g/L NaCl、3.5g/L 琼脂，pH7.0
4	溶菌肉汤培养基	LB	5g/L 酵母提取物、10g/L 胰蛋白胨、10g /L NaCl、3.5g/L 琼脂，pH7.0
5	胰蛋白胨大豆肉汤培养基	TSBA	15g/L 胰蛋白胨、5g/L 大豆蛋白胨、5g/L NaCl、3g/L 琼脂，pH7.0

蜡状芽胞杆菌及近缘种在各种培养基上的菌落形态变化见图 1-16。菌落边缘不整齐，边缘带有丝状物，在 TSBA 培养基上均较湿润，其他培养基上则呈干燥状。蜡状芽胞杆

菌生长较快，在 TSBA 培养基上菌落为圆形、扁平、湿润；在 NACL 培养基上菌落颜色较深、干燥；在 NA 和 GLU 培养基上菌落形态相同；在 LB 培养基上菌落圆形、干燥。

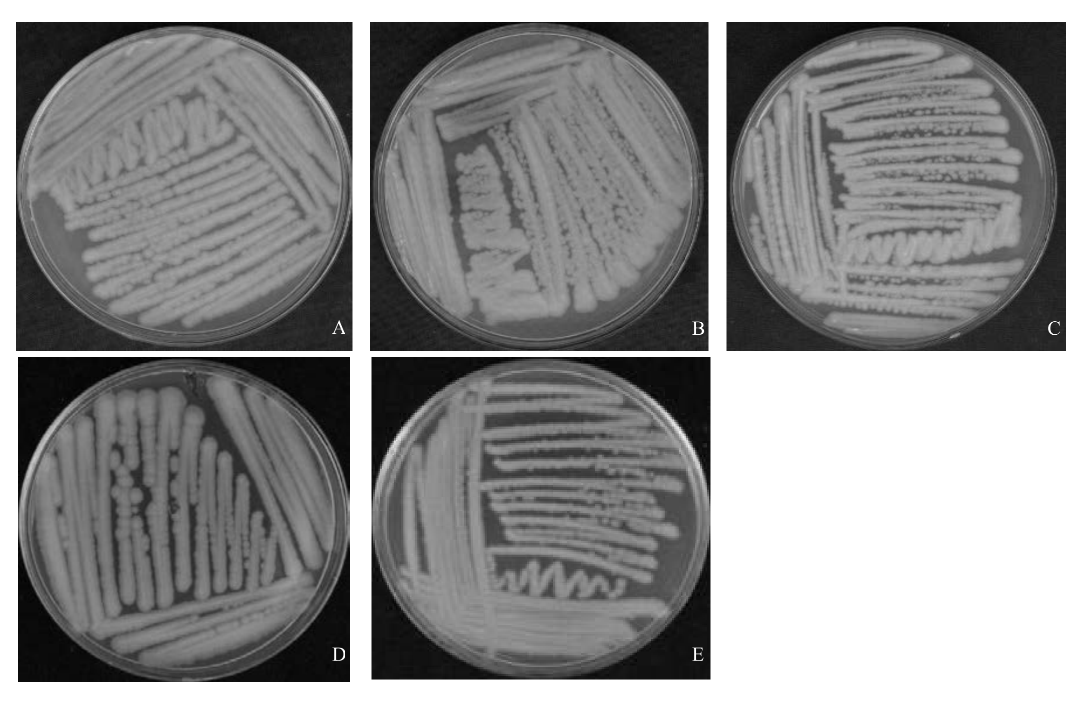
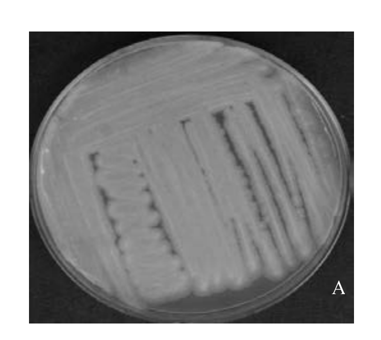
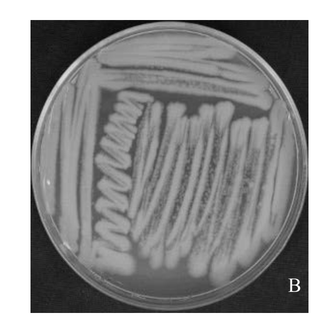


图 1-16　蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

苏云金芽胞杆菌在 TSBA 培养基上菌落近圆形、白色、边缘不整齐、“羽毛状”；在 LB 培养基上颜色相对较深、生长快、边缘不整齐；在 NA、NACL 和 GLU 培养基上颜色基本相同，菌落形态相同，圆形、边缘不整齐（图 1-17）。





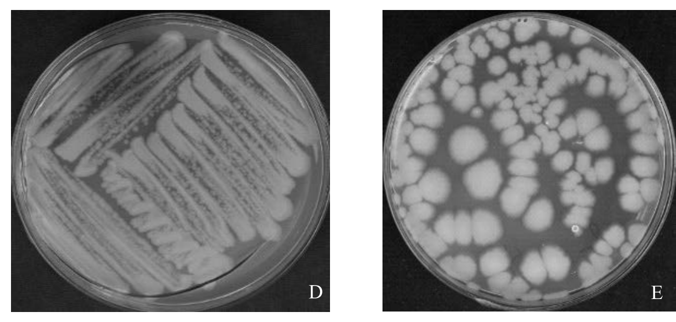


图 1-17　苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

蕈状芽胞杆菌在 TSBA 培养基上生长快、菌落边缘不整齐、菌落较湿；在 LB 培养基上菌落形态不规则，不如 TSBA 培养基上生长快，菌落较干、不易挑取；在 NA 和 NACL 培养基上菌落形态较相似；在 GLU 培养基上菌落较小，泛白色（图 1-18）。

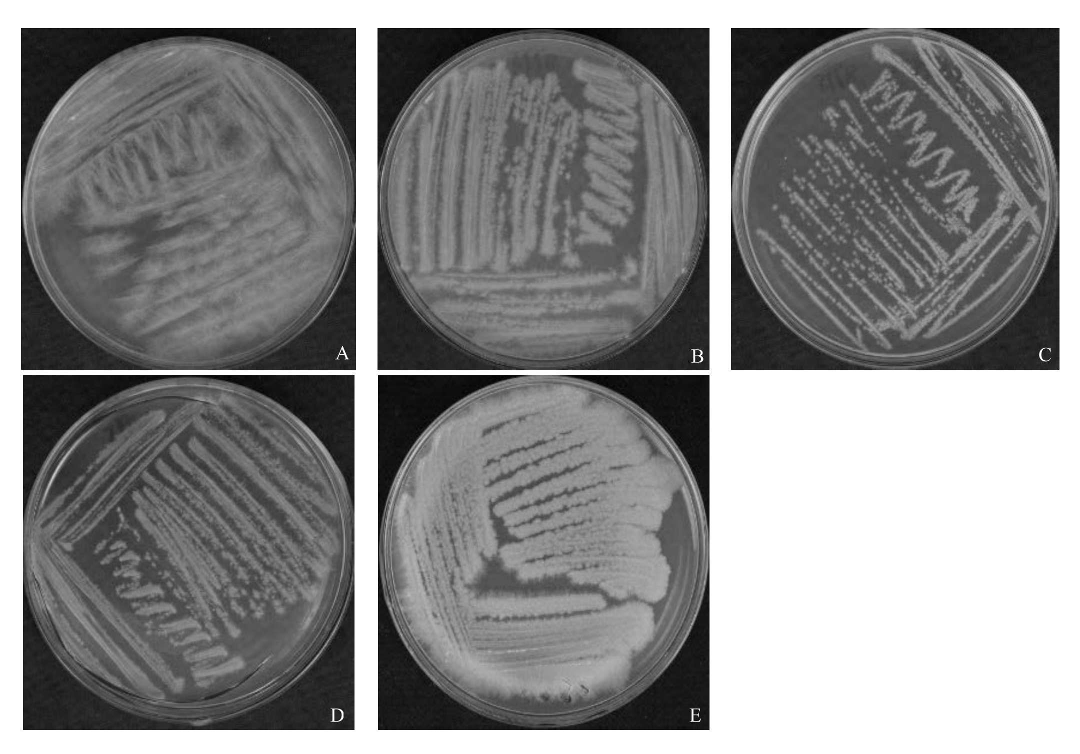


图 1-18　蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

假蕈状芽胞杆菌在 5 种培养基上菌落均为黄白色，形状不规则，生长迅速，菌落边缘不整齐，菌落较湿。在 LB 培养基上菌落形态不规则、菌落边缘根状分枝很明显；在 TSBA 培养基上生长快，菌落较干、不易挑取，菌落边缘根状分枝较明显；在 NA 和 NACL 培养基上菌落形态较相似，菌落边缘可见根状分枝；在 GLU 培养基上菌落较小、菌落边

缘根状分枝不明显（图 1-19）。

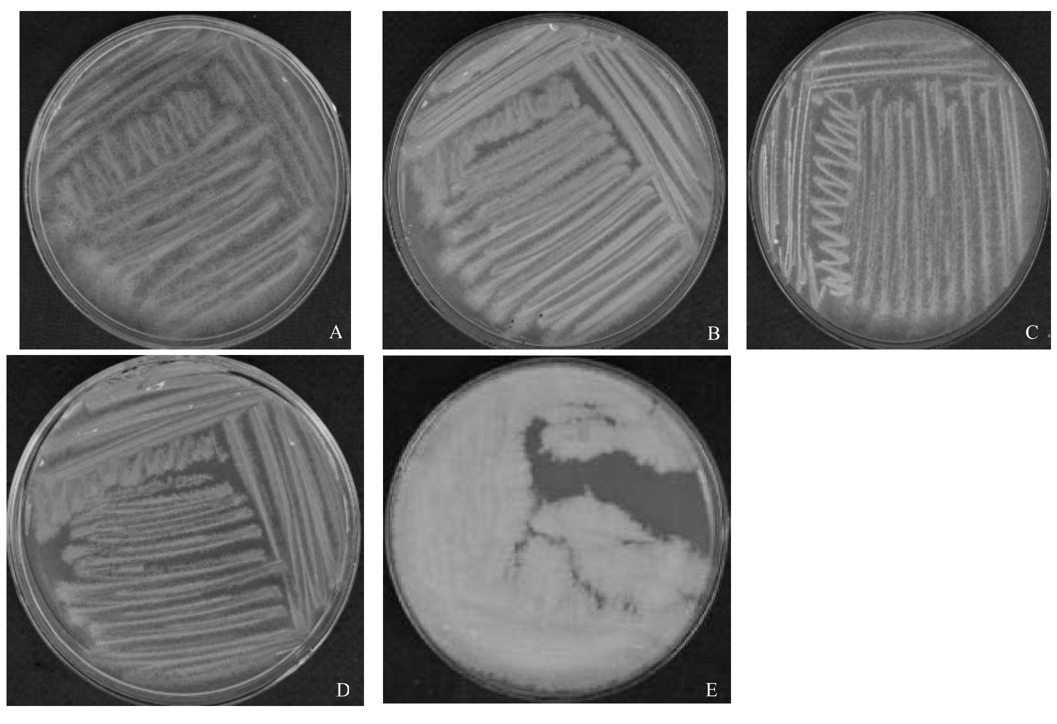
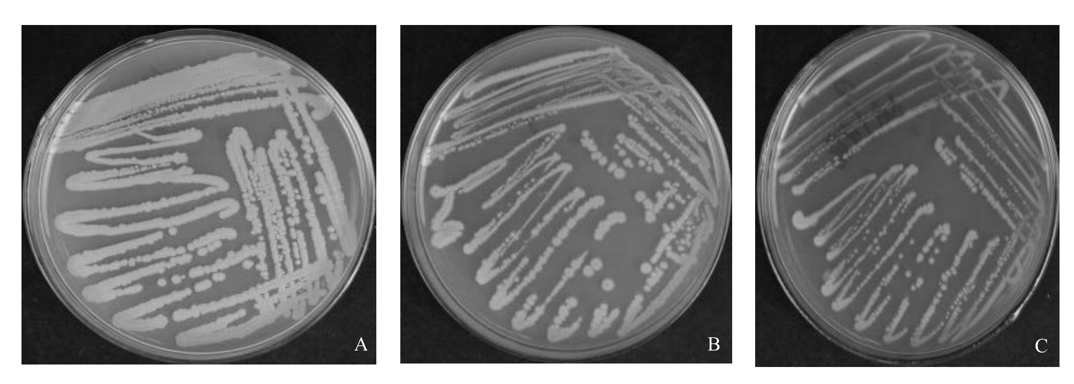


图 1-19　假蕈状芽胞杆菌（*B. pseudomycoides*）的菌落形态特征
A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

球形赖氨酸芽胞杆菌在 TSBA 培养基上菌落为浅黄色、圆形、有光泽；在 LB 培养基上菌落圆形、浅黄色、湿润、边缘整齐、扁平；在 NA 和 GLU 培养基上菌落形态基本相同，后者菌落直径较小，在 NACL 培养基上菌落扁平、颜色为培养基颜色、菌落相对较小（图 1-20）。



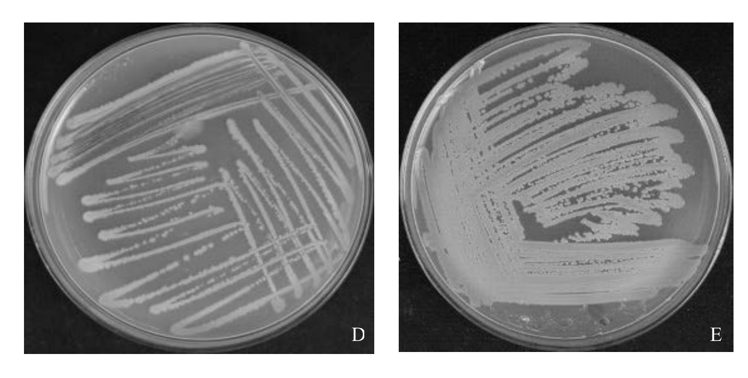


图 1-20　球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

纺锤形赖氨酸芽胞杆菌在 TSBA 培养基上菌落为黄色、圆形、有光泽、湿润、边缘整齐；在 NACL 培养基上菌落为黄色、圆形、边缘整齐；在 LB 培养基上菌落为褐黄色、圆形、湿润；在 NA 和 GLU 培养基上菌落形态相似，菌落圆形、白色、有光泽（图 1-21）。

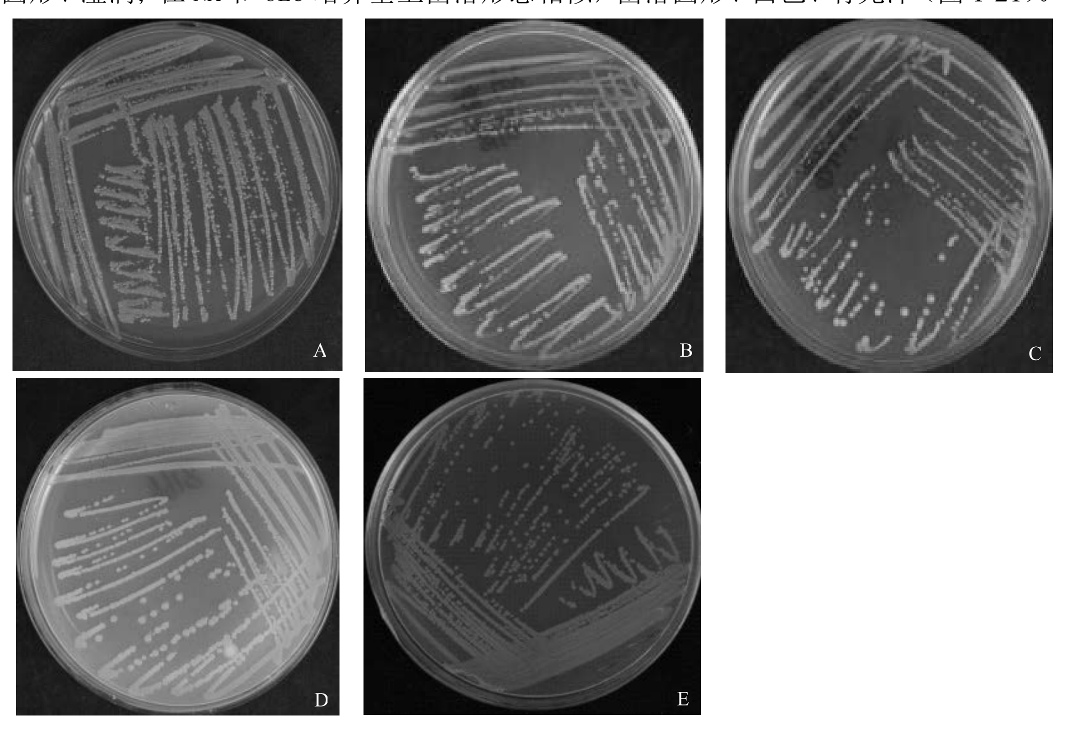


图 1-21　纺锤形赖氨酸芽胞杆菌（*L. fusiformis*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

奥德赛赖氨酸芽胞杆菌在 TSBA 培养基上菌落为圆形、黄色、边缘整齐；在 LB 培养基上菌落褐黄色、圆形、湿润；在 NA 和 GLU 培养基上菌落黄色、圆形；在 NACL 培养基上菌落浅黄色、圆形、湿润（图 1-22）。

解淀粉芽胞杆菌在 LB 培养基上菌落突起、圆形、有黏液；在 NA 培养基上菌落干

燥、圆形、扁平；在 NACL 培养基上菌落近圆形、扁平，表面形成一层菌膜；在 GLU 培养基上菌落生长茁壮、圆形、扁平，有些菌落表面形成一层膜；在 TSBA 培养基上菌落干燥、近圆形，菌落表面形成一层膜（图 1-23）。

深褐芽胞杆菌在 TSBA 培养基上菌落暗白色、干燥、产生黑色色素；在 LB 培养基上菌落褐色、较湿润；在 NA 培养基上菌落干燥、产生少量黑色色素；在 GLU 培养基上

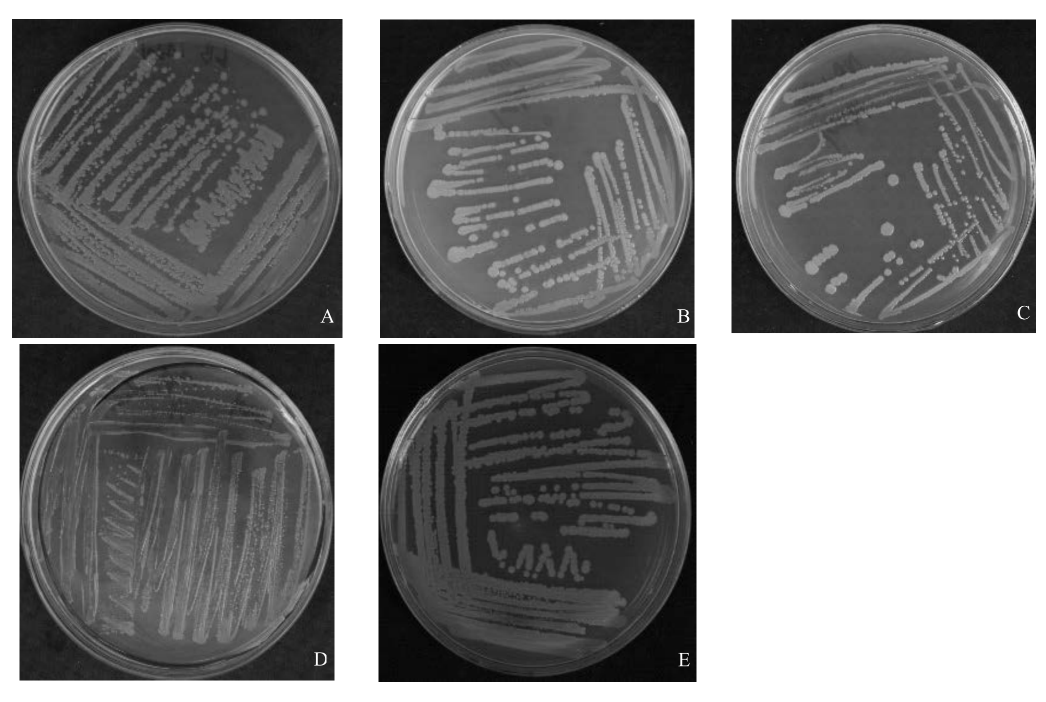
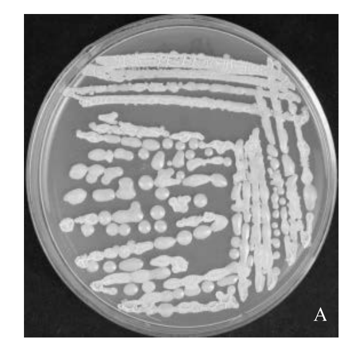


图 1-22　奥德赛赖氨酸芽胞杆菌（*L. odysseyi*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA



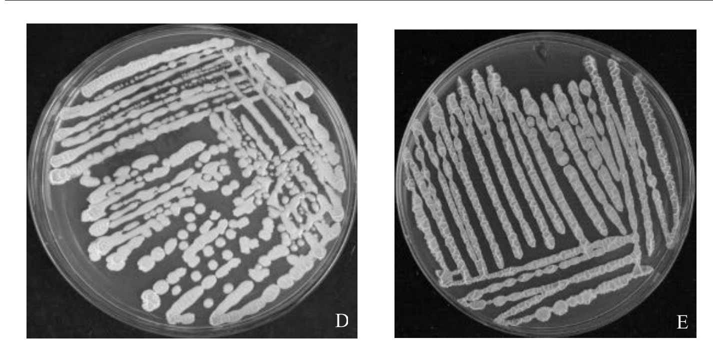


图 1-23　解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

菌落圆形、边缘“羽毛状”、不整齐；在 NACL 培养基上菌落湿润、为培养基颜色、较小、无光泽（图 1-24）。

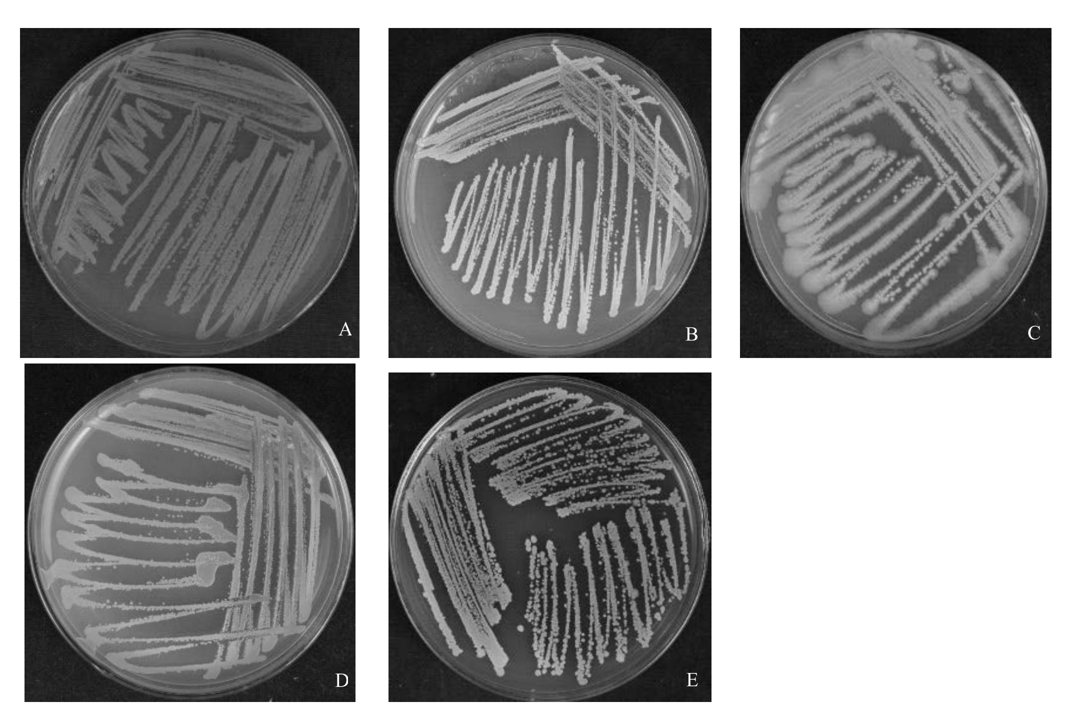


图 1-24　深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

地衣芽胞杆菌在 TSBA 和 LB 培养基上的菌落形态相似，菌落近圆形、边缘不整齐；在 LB 培养基上还产生黑色色素；在 NA、NACL 和 GLU 培养基上菌落较小，特征与 TSBA 培养基上基本相同（图 1-25）。

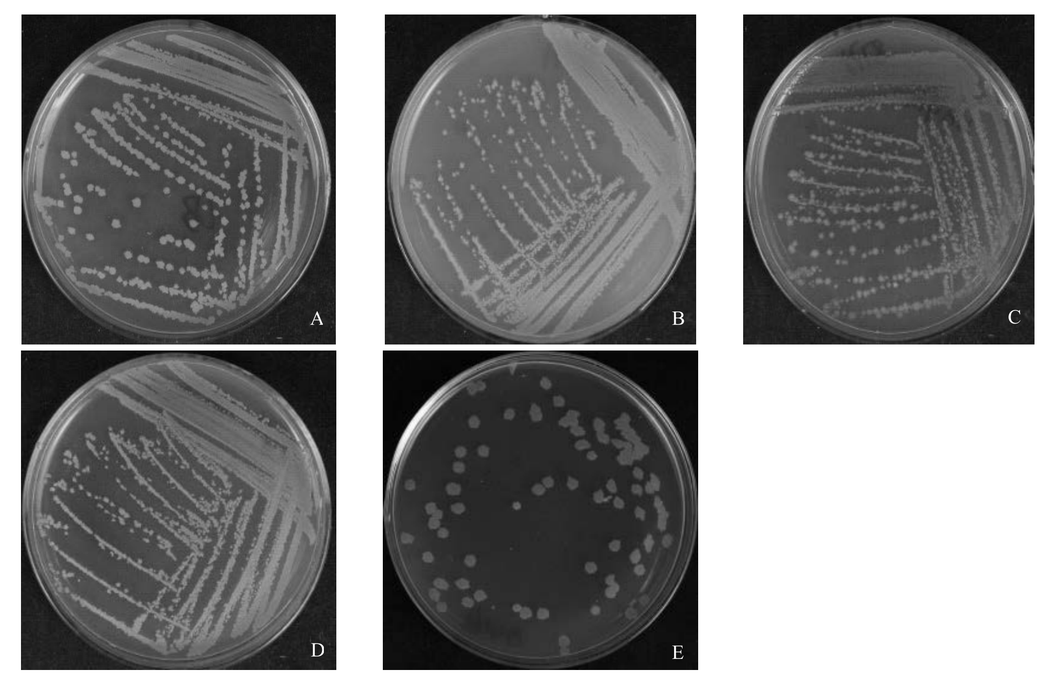
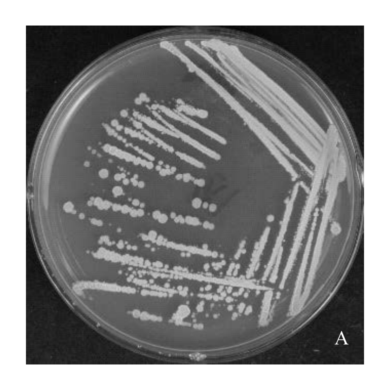
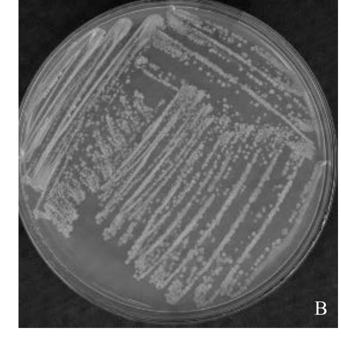
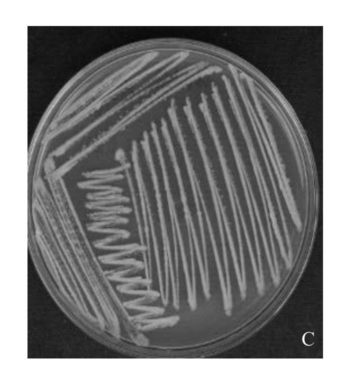


图 1-25　地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）的菌落形态特征
A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

莫哈维芽胞杆菌在5种培养基上的菌落形态差异较大，在TSBA培养基上生长最快，菌落最大，菌落为白色、近圆形、边缘不整齐、干燥、无光泽；在 LB 和 NACL 培养基上菌落颜色为白色，菌落较 TSBA 培养基上的小，其他特征相同；在 NA 培养基上菌落颜色为培养基颜色；在 GLU 培养基上菌落颜色为白色（图 1-26）。







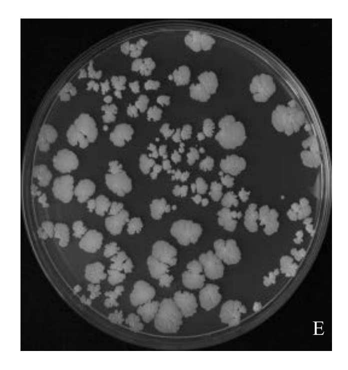


图 1-26　莫哈维芽胞杆菌（*B. mojavensis*）的菌落形态特征
A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

枯草芽胞杆菌斯氏亚种在 TSBA 培养基上菌落圆形、扁平、干燥、无光泽，有些菌落表面有褶皱；在 LB 培养基上产生褐色色素，菌落圆形、干燥、扁平、无光泽；在 NA 培养基上菌落圆形、干燥；在 GLU 培养基上菌落扁平、褐白色、干燥，表面有褶皱，产生色素；在 NACL 培养基上菌落为培养基颜色、相对较湿润、扁平、无光泽（图 1-27）。

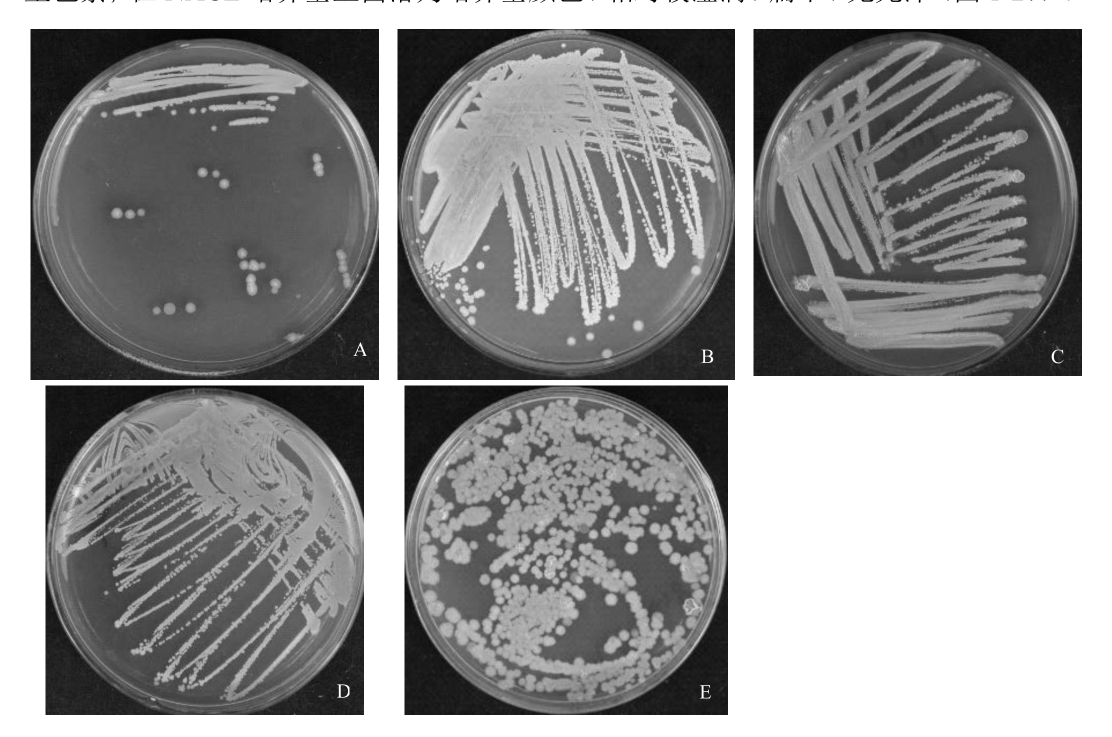


图 1-27　枯草芽胞杆菌斯氏亚种（*B. subtilis* subsp. *spizizenii*）的菌落形态特征
A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

枯草芽胞杆菌因氏亚种在 TSBA 培养基上菌落圆形、干燥、扁平、边缘不整齐、边缘为白色；在 LB 培养基上菌落圆形、白色、扁平；在 NA 培养基上菌落枯草状、干燥、扁平、边缘不整齐、暗白色；在 GLU 和 NACL 培养基上菌落相对较湿润，颜色为培养基颜色（图 1-28）。

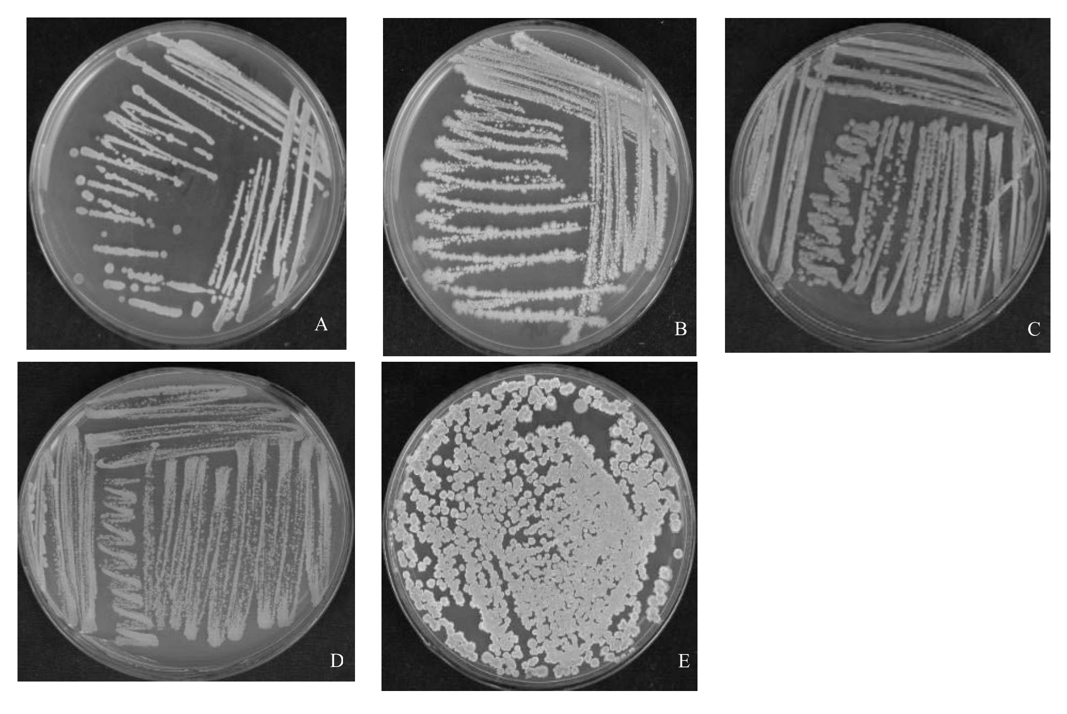
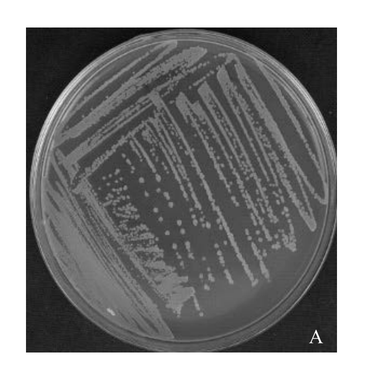


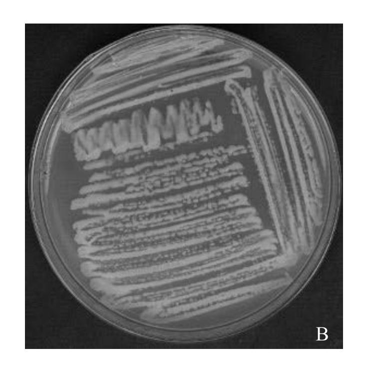
图 1-28　枯草芽胞杆菌因氏亚种（*B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）的菌落形态特征

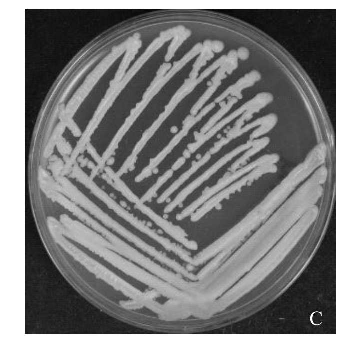
A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

枯草芽胞杆菌枯草亚种在 TSBA 培养基上菌落干燥、圆形、暗白色、扁平、无光泽；在 GLU 培养基上菌落白色、干燥、扁平、无光泽；在 LB、NA 和 NACL 培养基菌落圆形，相对较湿润（图 1-29）。

索诺拉沙漠芽胞杆菌在 TSBA 培养基上菌落较小、圆形、突起白色、湿润、有光泽；在 LB 培养基上菌落为培养基颜色、圆形，与 TSBA 培养基上的特征相近；在 NA 培养基上菌落白色、边缘不整齐；在 GLU 培养基上菌落黄白色、稍干燥、边缘不整齐、无光泽；在 NACL 培养基上菌落小，与 LB 培养基上的特征相近（图 1-30）。







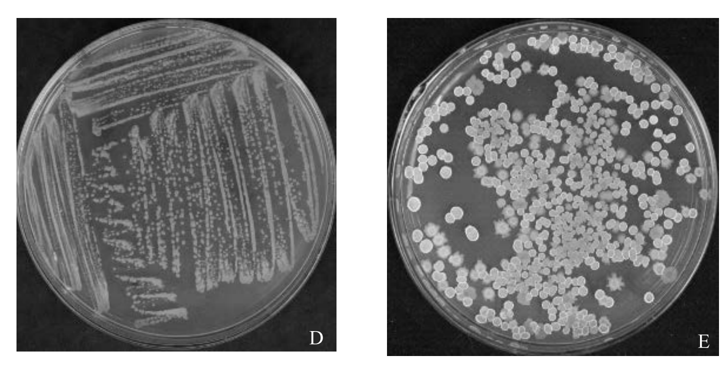


图 1-29　枯草芽胞杆菌枯草亚种（*B. subtilis* subsp. *subtilis*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

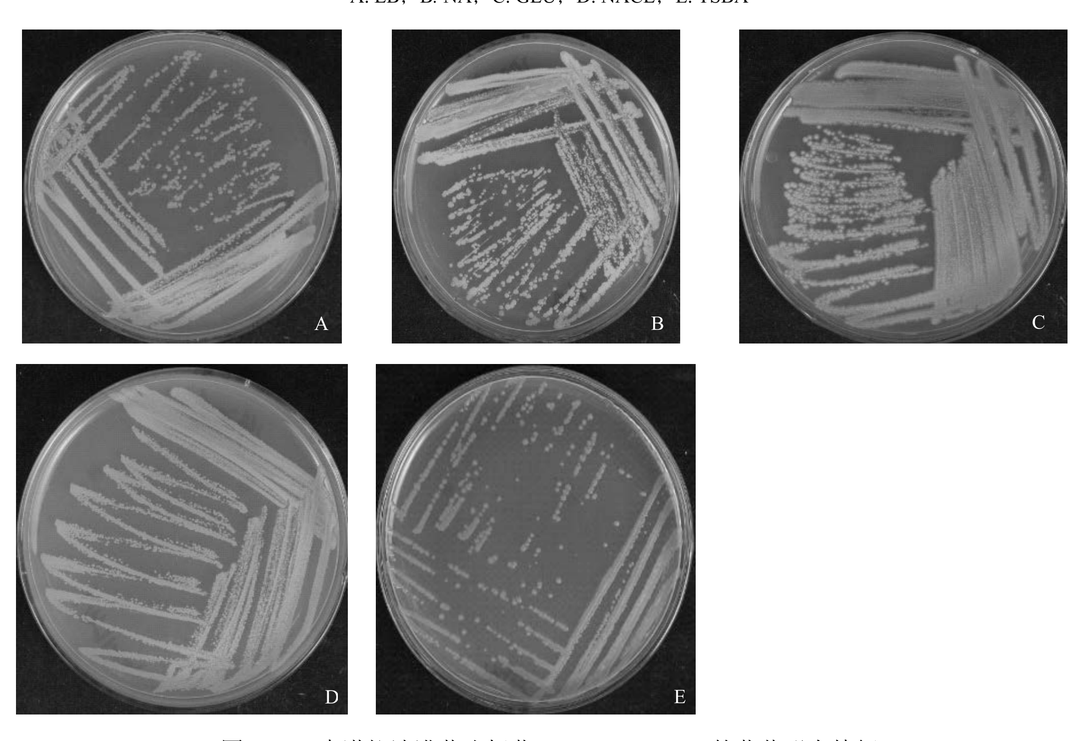


图 1-30　索诺拉沙漠芽胞杆菌（*B. sonorensis*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

巨大芽胞杆菌 TSBA 和 GLU 培养基上的菌落形态长势好，菌落圆形、突起、边缘整齐、无光泽；在 NA 和 NACL 培养基上菌落形态特征相同，菌落黏稠、易流动、生长快。巨大芽胞杆菌在 LB 培养基上菌落小、突起、生长相对较慢（图 1-31）。

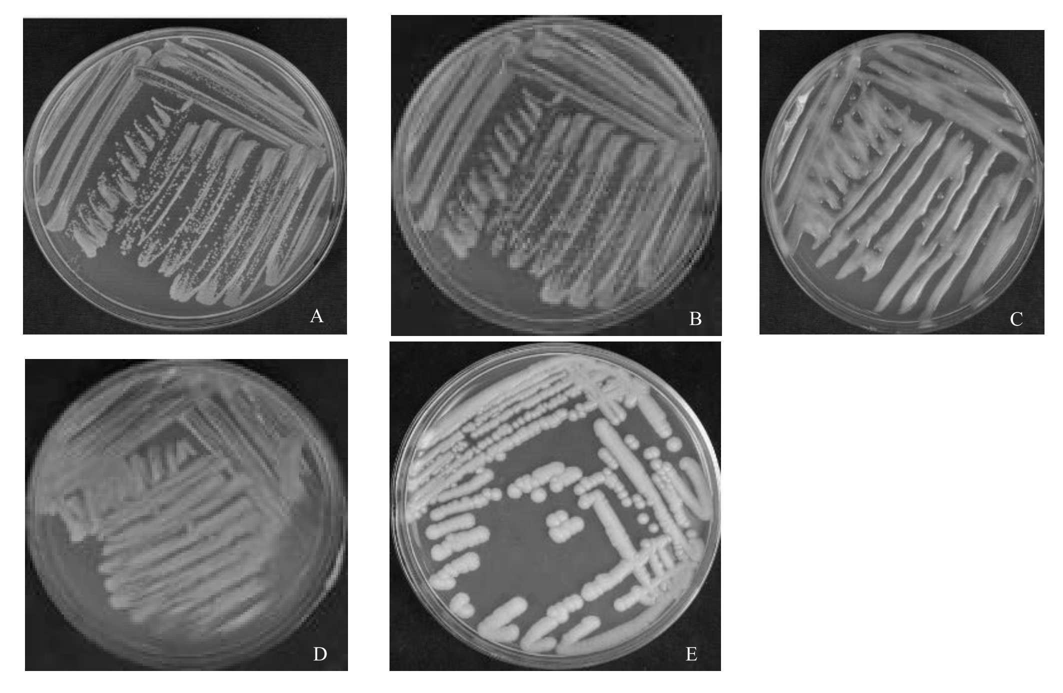
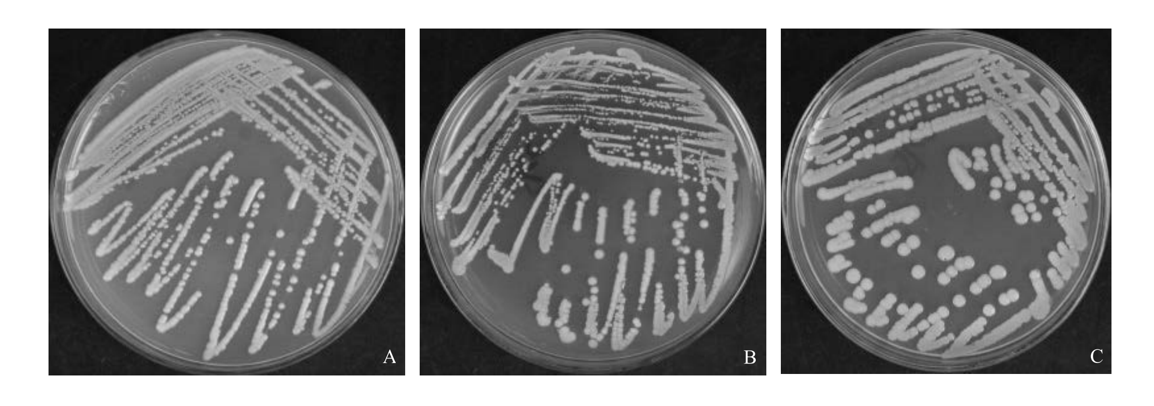


图 1-31　巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

简单芽胞杆菌在不同培养基上的菌落形态相差较大，在 TSBA 培养基上菌落较湿润、圆形、突起、边缘整齐；在 LB 培养基上菌落黄白色，圆形；在 NA 培养基上菌落黄白色、边缘整齐；在 GLU 培养基上菌落黄色、稍干燥、圆形、边缘整齐；在 NACL 培养基上菌落白黄色、较小，与 LB 培养基上的特征相近（图 1-32）。



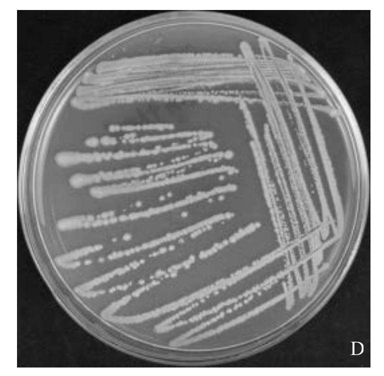


图 1-32　简单芽胞杆菌（*B. simplex*）的菌落形态特征

A. LB；B. NA；C. GLU；D. NACL；E. TSBA

六、讨论

狭义上的芽胞杆菌，仅指 *Bacillus* 属中的种类；广义上的芽胞杆菌是指由 *Bacillus* 属分化出来的芽胞杆菌近缘属的种类、乳酸杆菌的种类、不属于芽胞杆菌但书写形式上类似芽胞杆菌的种类，即在属名中含有 *Bacillus* 词根的种类，如 *Brevibacillus*、*Lactobacillus* 的种类。本书是以 *Bacillus* 属中的种类和由 *Bacillus* 属分化出来的芽胞杆菌近缘属的种类为研究对象。芽胞杆菌菌落特征是接触芽胞杆菌种类的第一形态信息，在现代分类学技术发展之前，菌落形态是芽胞杆菌种类鉴定的重要特征，尽管现今芽胞杆菌菌落特征不是重要的分类特征，但是，作为认识芽胞杆菌种类的特征之一，在相同培养条件下，同一个种的芽胞杆菌菌落特征是稳定的。

芽胞杆菌细胞形态变化与菌落形态变化有关。总体上说，芽胞杆菌都是杆状，不同种类的区别在于杆状长度、顶端是否圆形、中间是否膨大等。本书研究的芽胞杆菌都能产生芽胞，芽胞不是生殖体，而是营养体，芽胞杆菌的芽胞形态相对稳定，这也是种类鉴定的形态根据之一。在特定条件下，芽胞杆菌产生芽胞，能抵抗恶劣环境，在适合的条件下，芽胞萌发产生细胞继续生长。部分芽胞杆菌在产生芽胞时，伴随有伴胞晶体的产生，伴胞晶体都有一定的功能，如苏云金芽胞杆菌的伴胞晶体具有杀死昆虫（鳞翅目）的功能，因此作为生物杀虫剂。

芽胞杆菌菌落形态是种类识别的重要特征。芽胞杆菌菌落差异较大，不同种芽胞杆菌，菌落特征不同；同一种芽胞杆菌的不同菌株，菌落特征也存在着差异；不同培养基培养出来的芽胞杆菌菌落特征也不同。芽胞杆菌的表型特征受基因型和外部环境因子的控制，环境因子会影响其表现特征。芽胞杆菌属的菌落形态与系统发育存在着相关性，特别在 16S rRNA 相似性为 98%以下的两个芽胞杆菌种，如果菌落形态差异大，则存在新种的可能性很高。研究发现，不同培养基的同种芽胞杆菌的菌落形态特征差异很大，芽胞杆菌在 TSBA 培养基上的菌落生长最快，NA 和 NACL 这两种培养基上的生长状况基本相同，菌落形态特征基本相同。

第二节　芽胞杆菌营养需求

一、概述

1. 微生物营养需求

微生物同其他生物一样，需要不断地从它的外部环境中吸收所需要的各种物质，来合成本身的细胞物质和提供机体进行各种生理活动所需的能量，使机体能进行正常的生长与繁殖，才能保证生命能够维持与延续，保持生命的连续性。那些能够满足机体生长、繁殖和完成各种生理活动所需要的物质通常称为营养物质（nutrient）。这些营养物质在机体中的作用可以概括为参与细胞组成、构成酶的活性成分与物质运输系统以及提供机体进行各种生理活动所需要的能量。微生物获得与利用营养物质的过程通常称为营养（nutrition）。营养物质是机体进行各种生理活动的物质基础。根据对各类微生物细胞物质成分的分析发现，微生物细胞的化学组成和其他生物相比，没有本质上的差别。微生物细胞平均含水分 80%以上。其余 20%左右为干物质，在干物质中有蛋白质、核酸、碳水化合物、脂类和矿物质等。这些干物质是由碳、氢、氧、氮、磷、硫、钾、钙、镁、铁等主要化学元素组成，其中碳、氢、氧、氮是组成有机物质的四大元素，占干物质的 90%～97%。其余 3%～10%是矿质元素。除上述磷、硫、钾、钙、镁、铁外，还有一些含量极微的钼、锌、锰、硼、钴、碘、镍、钒等微量元素。这些矿质元素对微生物的生长也起着重要的作用。

2. 芽胞杆菌营养需求的研究进展

芽胞杆菌营养需求有其特殊性，可以适应营养丰富的环境，也可以适应营养贫瘠的环境。许多芽胞杆菌是先锋生物，可以在岩石上生长，分解岩石中的营养成分，提供给苔藓生长，为土壤形成提供生物条件。芽胞杆菌营养需求主要解决培养生长和发酵生产过程所需的碳源、氮源、微量元素等质和量的关系，在我国，前人对 14 种芽胞杆菌营养需求进行过研究，现综述如下。

（1）地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）

碳源、氮源、各种维生素和金属离子对微生物培养有重要影响，先采用单因素，后采用复合因素的方式，确定碳源和氮源，然后采用中心复合设计分析法对地衣芽胞杆菌 NG521-1 的培养基主要成分进行分析和优化，根据预测最优发酵水平的配比，调整培养基，使发酵液中菌体生长量大大提高，由原来 0.35×10^8 个/ml 提高到 1.2×10^8 个/ml（吴晟旻和范伟平，2005）。对地衣芽胞杆菌发酵培养基进行优化，并在此基础上确定最佳培养条件，为实现其工业化生产提供参考。借鉴谷春涛（2004）等关于地衣芽胞杆菌 TS-1 液体培养发酵条件的研究成果，对培养基进行优化，并运用单因素试验和四因素三水平正交试验对其培养基进行改进，对地衣芽胞杆菌发酵条件进行优化以得到其最佳温度、pH 和接种龄。4 种因素对地衣芽胞杆菌发酵影响的显著性次序为玉米浆>豆饼粉浸汁>蛋白胨>葡萄糖。培养基的最佳配比为：玉米浆 0.45g，蛋白胨 1.50g，豆饼粉浸汁 15g，葡

萄糖 1.50g。最适宜种龄为 18h，接种量 8%，起始 pH7.5，最佳温度 37.5℃，在此条件下地衣芽胞杆菌对数生长期为 14～20h，发酵周期为 22～24h，活菌数每单位提高近 1 亿个，发酵周期比经验周期缩短 10h。试验得出了地衣芽胞杆菌发酵培养基的最佳配比及最佳培养条件，在此条件下培养，收获菌体量大大提高，降低了生产成本（丰贵鹏和杨丽云，2009）。为了研制新型微生态制剂，以常用益生菌菌株——地衣芽胞杆菌为试验菌株，在测定了初发菌株的极限耐受性后，运用紫外诱变技术筛选得到一株耐酸性较强、耐胆盐、耐高温的地衣芽胞杆菌 D-11，其极限耐受条件为 pH4.18，胆盐浓度 0.4g/L，温度 58℃；并通过试验对该菌株进行了形态和生理生化特征的鉴定，最后通过单因素和正交试验对地衣芽胞杆菌 D-11 的发酵培养基成分配比进行了选择和优化，为以后的工业化生产提供依据。结果显示，当培养基的配比浓度为玉米淀粉 15g/L、豆粕 90g/L、玉米浆 6g/L 时，菌体的培养效果最好（江敏和梁金钟，2007）。为了提高地衣芽胞杆菌 A2 发酵液的活菌含量，采用 Hackett-Burman 设计和响应面法对其发酵培养基进行优化。先用 Plackett-Burman 设计从 8 种原料中筛选出对活菌含量有显著影响的因素，再用最陡爬坡试验及 Box-Behnken 设计进一步优化。结果表明，$MgSO_4·7H_2O$、酵母粉和尿素是影响发酵液活菌含量的显著因素，优化后的培养基为可溶性淀粉 5g/L、尿素 1.29g/L、K_2HPO_4 6g/L、KH_2PO_4 3g/L、$MnSO_4·H_2O$ 0.2g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.41g/L、豆粕 10g/L 和酵母粉 0.99g/L。在此条件下，发酵液中菌株 A2 的活菌含量可以从优化前的 $4.73×10^{10}$CFU/ml 提高到 $1.30×10^{11}$CFU/ml（陈雄等，2009）。研究实验室自分离的地衣芽胞杆菌 KL6 作为微生物饲料添加剂的可行性，并对其发酵培养基进行优化，确定最佳培养条件，为工业化发酵提供依据。运用表型试验对其进行生理生化评价及产酶评价；运用四因素三水平正交试验和单因素试验对其培养基进行改进，并对其发酵条件进行优化。地衣芽胞杆菌 KL6 的 D-葡萄糖产酸试验、硝酸盐还原试验、淀粉水解试验等均呈阳性；4 种因素对活菌数影响的显著性次序为 $MnSO_4$>NaCl>酵母粉>蛋白胨，对芽胞数影响的显著性次序为 $MnSO_4$>蛋白胨>酵罐放大培养，最佳放罐时间应为 14～16h，获得的菌体数量约 $1.02×10^{11}$ 个/ml，芽胞率为 97.11%。体外评价试验表明，地衣芽胞杆菌 KL6 具有作为微生物饲料添加剂的潜力。发酵培养基及条件优化试验表明，地衣芽胞杆菌 KL6 能够适于高密度液体发酵。该试验为以菌株 KL6 为基础的微生物饲料添加剂的开发和大规模发酵培养提供了理论（刘阳等，2012）。从水产养殖环境中分离、筛选得到一株菌株 CJ001，经菌落形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 测序，鉴定其为地衣芽胞杆菌。地衣芽胞杆菌可有效降低养殖水体中的化学需氧量（COD），48h 内 COD 的降解率达 86.8%，水温 30℃时的降解率最高，达 85.7%，为优化培养基组成，选出由单因素试验确定的营养物质（红糖、玉米粉、豆粕、尿素）和 NaH_2PO_4，进行五因素四水平的正交试验。结果表明，菌株 CJ001 的最佳培养基配方为红糖 3%、玉米粉 1%、豆粕 3%、尿素 0.25%、NaH_2PO_4 0.15%（袁科平等，2011）。

（2）解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）

采用正交试验方法，进行了解淀粉芽胞杆菌发酵产 β-葡聚糖酶培养基的优化。结果表明，采用玉米粉 30g/L、大麦粉 40g/L、豆饼粉 30g/L、$Na_2HPO_4·12H_2O$ 6 g/L、（NH_4）$_2SO_4$ 4g/L、$CaCl_2$ 8g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1g/L 组成的培养基发酵，β-葡聚糖酶活性达 128.55U/ml，

在 β-葡聚糖酶溶液中添加大分子亲水型多糖黄原胶、动物蛋白明胶、甘油、氯化钠可明显提高 β-葡聚糖酶的热稳定性。将添加甘油 120g/L、黄原胶 5g/L 复合稳定剂的葡聚糖酶溶液 60℃处理 2h，酶液的残余酶活比未经处理的酶活提高了 55.3%（郝秋娟等，2006）。为了提高解淀粉芽胞杆菌 BW-13 抗真菌活性物质的产量，首先用单因素试验研究不同碳源、氮源和微量元素对菌株 BW-13 产生抗真菌活性物质的影响，并使用均匀设计法对培养基进行优化。结果表明：玉米粉和低浓度的 Mn^{2+}都对 BW-13 产抗真菌活性物质的促进效果明显。最佳培养基配方和发酵条件为：玉米粉 32g/L，氯化锰 5mg/L，初始发酵 pH5.0，装液量 30ml，接种量为 4%，培养温度 28℃，摇床转速 200r/min，培养时间 144h。优化后 5μl 发酵液抑菌圈提高到 28.5mm，比优化前提高了 28.94%（章小洪等，2013）。

（3）短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）

在摇瓶培养条件下，采用单因素与正交试验相结合的方法，对影响短小芽胞杆菌 TY079 产抗菌物质发酵培养基的主要成分进行优化，得到最佳培养基为：葡萄糖 0.5%、玉米粉 0.5%、蛋白胨 1.5%、豆饼粉 0.5%、KH_2PO_4 0.75%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.2%，优化后抑菌圈直径是优化前的 1.42 倍（张蕾等，2010）。

（4）多粘类芽胞杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）

10 倍稀释法筛选出最佳产抑菌活性物质的多粘类芽胞杆菌 Dw-6，试验表明菌株 Dw-6 最佳培养基为发酵培养基。利用四因素均匀设计方案进行培养基配方的优选，同时进行培养时间和发酵条件的优化。结果表明，菌株 Dw-6 优化后的培养基配方（50ml）为蛋白胨 3.83g、酵母浸出粉 3.9g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.105g、$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.17g，最佳培养时间 48h，初始 pH 7.0，培养温度 30℃。经培养基优化后，菌株 Dw-6 在培养基初始 pH7.0 时，30℃培养 48h 的发酵上清液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及出芽短梗霉菌均表现出很强的抑制作用（文凤云等，2011）。采用正交试验方法，对多粘类芽胞杆菌的发酵培养基进行优化，通过统计学分析，确定发酵培养基，并利用 30L 发酵罐进行试验，测定发酵过程中相关参数，确定生长代谢曲线。结果表明，发酵效价由优化前的 $8.6×10^4$U/ml 提高到 $12.9×10^4$U/ml，提高近 1.5 倍（刘凤权等，2007）。以木糖为唯一碳源筛选了 10 株乙偶姻生产菌株，对乙偶姻产量最高的菌株进行 16S rDNA 鉴定，测序结果表明该菌株为多粘类芽胞杆菌，命名为 LY107。经单因素试验优化培养条件为：培养温度 37℃、pH7.0、装液量 15ml/250ml、接种量 5%（体积比）。采用葡萄糖∶木糖（2∶1，质量比，下同）为碳源模拟木质纤维素水解液发酵生产乙偶姻，经 Plackett-Burman 设计和 RSM 优化培养基组分为：葡萄糖∶木糖（2∶1）60g/L、蛋白胨 5g/L、酵母粉 16.5g/L、硫酸锰 0.05g/L、硫酸亚铁 0.005g/L、磷酸二氢钾 0.1g/L、乙酸钠 2.47g/L。在优化培养条件和培养基组分下，乙偶姻最高产量达 23.9g/L，葡萄糖-木糖转化率为 79.9%（张燎原等，2012）。

（5）海洋芽胞杆菌（*B. marinus*）

对一株海洋芽胞杆菌 B-09 产胞外多糖的较佳培养基及多糖黏度性质进行了初步研究。结果表明，菌株 B-09 产胞外多糖的较佳培养基是：蔗糖 60g/L、酵母膏 5g/L、玉米浆 10g/L、海水添加量 0.8L、培养基初始 pH 为 8.0。在此条件下，多糖产量为 4.59g/L。多糖溶液浓度与比浓黏度呈线性相关，特性黏度为 0.28dl/g。多糖黏度具有较好的 pH 稳

定性和耐热性，对 Na^+、Ca^{2+}、K^+电解质有较好的稳定性，Mg^{2+}电解质对多糖溶液的黏度有较大的影响（张熹等，2011）。

（6）耐盐芽胞杆菌（*B. halodurans*）

分离到一株产碱性木聚糖酶的革兰氏阳性菌株，通过菌落形态及 16S rDNA 序列同源性分析，确定该菌株为短小芽胞杆菌。生长条件和产酶条件研究结果显示，最适温度和 pH 分别为 50℃和 8.0。培养基优化试验显示在有机和无机混合氮源条件下（NH_4NO_3 0.57%、牛肉膏 1%、蛋白胨 0.5%、酵母提取物 0.5%、木聚糖 0.5%），木聚糖酶产量达最高（180U/ml）。酶学试验表明最适反应条件为 50℃，pH8～9；在 pH9 的条件下，孵育 120min 仍具有 75%的活力，表明该酶具有较强的碱耐受性（曹要玲等，2006）。

（7）胶质芽胞杆菌（*B.mucilaginosus*）

通过单因素及正交试验，对一株胶冻样芽胞杆菌的培养基组成（碳、氮、生长因子、无机盐）及工艺条件（温度、起始 pH、装液量）进行了研究。结果表明，比较理想的配方是：糖蜜 2%、豆粕 0.5%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.1%、K_2HPO_4 0.05%、$CaCO_3$ 0.1%，起始 pH7.5，培养温度 36℃，装液量 30ml/250ml 锥形瓶。在此基础上利用 70L 发酵罐进行发酵，培养周期 33h，芽胞量可以达 $9.58×10^8$CFU/ml，高于国家规定的液体菌肥 $5×10^8$CFU/ml 的标准，解决了原配方不产芽胞的难题，培养周期缩短了一半（吴向华和刘五星，2006）。通过单因素及正交试验对一株胶质芽胞杆菌 NS01 的培养基组成（碳、氮、生长因子、无机盐）及工艺条件（温度、起始 pH、装液量）进行了研究。结果表明比较理想的培养基配方为：葡萄糖 1%，硫酸铵 0.15%，酵母膏 0.01%，KCl 0.01%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.01%，NaH_2PO_4 0.01%，$CaCO_3$ 0.1%。装液量 50ml/250ml 锥形瓶。在此条件下活菌数可达 6.5 亿 CFU/ml，是传统的胶质芽胞杆菌淀粉铵培养基下活菌数的 260%（刘五星和徐旭士，2002）。

（8）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

采用响应面法对发酵生产胞苷的培养基进行优化，通过二水平正交试验考察葡萄糖、玉米蛋白粉、玉米浆、K_2HPO_4、尿素、起始 pH 和发酵温度对发酵生产胞苷的影响，利用极差分析寻找发酵生产胞苷的主要影响因子，利用中心组合设计与响应面法进一步考察主要影响因子，结果表明，发酵生产胞苷的主要影响因子分别为 K_2HPO_4、玉米浆和葡萄糖。在优化培养基中，胞苷产量增加 2 倍，达 1.898g/L，试验值与预测值基本相符（黄艳辉等，2007）。菌株 BAB-1 是从土壤中分离出的对番茄灰霉病具有较好防治效果的拮抗细菌。通过对该菌株进行形态特征观察、16S rDNA 序列分析和 API50CHB 细菌鉴定试剂盒鉴定，确定菌株 BAB-1 为枯草芽胞杆菌。采用 16 种培养基对菌株 BAB-1 进行了发酵培养，结果表明，3 号培养基最适合该菌株菌体生长和抑菌物质的产生。进一步进行了培养条件的优化，发现在培养温度 30℃，转速 210r/min，初始 pH7.24，接种量 3%，装样量为 70ml/250ml 时菌体生产量最高，菌量达 $1.63×10^9$CFU/ml；而在培养温度 30℃，转速 210r/min，初始 pH7.24，接种量 2%，装样量为 100ml/250ml 时最适合抑菌物质的产生，对番茄灰霉病菌的抑菌圈直径达 1.81cm（刘宁等，2009）。为提高枯草芽胞杆菌拮抗性次生代谢产物的产量，通过单因素试验研究了 $CaCl_2$、$FeSO_4$、$MnSO_4$、$MgSO_4$、$ZnSO_4$ 等金属无机盐对枯草芽胞杆菌 BS501a 发酵液拮抗效果的影响。结果表明：

当分别向基础培养基中添加 0.15%～0.2% $CaCl_2·2H_2O$、0.01% $FeSO_4·7H_2O$、0.01% $MnSO_4·H_2O$、0.05% $MgSO_4·7H_2O$ 和 0.1% $ZnSO_4·7H_2O$ 时，发酵液抗稻瘟病菌活性均有不同程度提高。通过正交试验，确定各种金属无机盐的最佳组合为：0.15%$CaCl_2·2H_2O$、0.01%$FeSO_4·7H_2O$、0.01%$MnSO_4·H_2O$、0.05%$MgSO_4·7H_2O$ 和 0.15%$ZnSO_4·7H_2O$，利用枯草芽胞杆菌 BS501a 发酵上清过滤液室内防治稻瘟病，防治效率为 63.86%（李瑞芳等，2010）。利用合成培养基为筛选培养基，以枯草芽胞杆菌 B6-1 为初发菌株，经过三轮紫外线诱变和一轮硫酸二乙酯诱变得到了 γ-聚谷氨酸高产突变株枯草芽胞杆菌 W003，摇瓶液体发酵的 γ-聚谷氨酸产量由初发菌株的 10.9g/L 提高到 20.5g/L。单因素试验结果表明，该菌产 γ-聚谷氨酸的合适碳源为葡萄糖，氮源为硫酸铵。通过正交试验得到了优化的培养基配方，经 36h 液体发酵，γ-聚谷氨酸产量可达 45.3g/L（吴学超等，2008）。对枯草芽胞杆菌 FS106 产杆菌肽的发酵培养基进行优化。单因素优化结果表明，最佳碳源是玉米粉，最佳有机氮源是蛋白胨，最佳无机氮源是 KNO_3，最佳生长因子是牛肉膏。通过二水平 Plackett-Burman 设计确定最佳的培养基配方为：玉米粉 7.5g/L、蛋白胨 15g/L、KNO_3 1g/L、牛肉膏 7.5g/L、NaCl 5g/L、$CaCO_3$ 0.75g/L、$ZnSO_4·7H_2O$ 0.0075g/L（陈燕等，2012）。为获得以沼液为基础的枯草芽胞杆菌 S37 的最佳发酵培养基。采用 Plackett-Burman 设计和响应面法对以沼液为基础的枯草芽胞杆菌 S37 抑菌蛋白的发酵培养基进行优化。在 Plackett-Burman 设计基础上确定对抑菌蛋白影响较大的 4 个显著因素：$MgSO_4·7H_2O$、玉米粉、KH_2PO_4 和豆粕；通过最陡爬坡试验，中心组合设计及响应面法确定枯草芽胞杆菌 S37 的最优发酵培养基组成为 $MgSO_4·7H_2O$ 2.95g/L、$(NH_4)_2SO_4$ 2.4g/L、NaCl 3.0g/L、KNO_3 4.41g/L、$CaCO_3$ 5.89g/L、$ZnCl_2$ 1.11g/L、玉米粉 4.18g/L、KH_2PO_4 4.14g/L 和豆粕 2.79g/L。在优化条件下进行发酵验证，试验值和预测值较接近，吻合度较高，相对误差较小，枯草芽胞杆菌抑菌圈达 1.94cm，比优化前提高 8.38%；用此培养基发酵产物滴施棉苗根际土壤，与对照相比，相对防效达 45.94%（杜娟等，2013）。在摇瓶发酵条件下，采用 Plackett-Burman 设计和响应面法对枯草芽胞杆菌 BDT-3 的培养基配方进行优化，确定了影响菌株 BDT-3 发酵液含菌量的 3 个重要因子依次为玉米粉、蛋白胨和淀粉；对这 3 个因子进行最陡爬坡试验，通过响应面法确定了主要影响因子的最佳条件。相比采用初始发酵培养基提高了 11.49%（胥海东等，2011）。通过 Plackett-Burman 设计，从葡萄糖、果糖、豆粕、氯化铵、乙酸铵、硫酸铵、蛋白胨、酵母提取物、K_2PHO_4、KH_2PO_4、$CaCl_2$ 等 11 个相关因子中筛选出对枯草芽胞杆菌产果胶裂解酶具有显著影响的因子——果糖、豆粕和酵母提取物，选取豆粕和酵母提取物因子进行响应面法分析、研究，果胶裂解酶活性最大为 22.69U/ml（杨秀松和张新平，2012）。从生产实际出发，针对生产用菌种，通过对培养基碳源、氮源等选择及配比的正交试验，得出最适培养基（吴俊罡等，2003）。采用单因素及正交试验法对枯草芽胞杆菌的培养基在摇瓶中进行优化，优化后的培养基为葡萄糖 15g/L、酵母浸出物 5g/L 和 $MgSO_4$ 5g/L；并通过单因素试验法确定了最佳培养条件为温度 35℃，初始 pH6.0，接种量 3%，装液量 20ml/250ml，发酵时间 12h（秦艳等，2007）。利用基因工程手段获得的产长野芽胞杆菌普鲁兰酶的枯草芽胞杆菌基因工程菌株 WB600/pWB-pulB，通过单因素筛选及正交试验进行发酵培养基优化，得到产酶最佳配方为玉米淀粉 3.0%、酵母膏 2.0%、$CaCl_2$ 0.03%、

Na_2HPO_4 1.0%。同时对重组菌株在摇瓶条件下液体发酵的主要影响因素如初始 pH、接种量、装液量、转速、温度等进行探讨，确定了产酶最佳培养条件为，以 3%接种量接种于优化后培养基，初始 pH7.0，装液量 30ml/250ml，37℃，200r/min 摇床培养 36h。在此优化条件下，普鲁兰酶活性达 20.16U/ml，是之前研究结果（10.94U/ml）的 1.84 倍（刘逸寒等，2011）。利用基因工程手段获得的产耐酸性高温 α-淀粉酶基因枯草芽胞杆菌工程菌株 pWB-amyd/WB600，通过单因素筛选及正交试验进行发酵培养基优化，得到的最佳配方为：玉米粉 20g/L、蛋白胨 30g/L、$CaCl_2$ 0.5g/L、Na_2HPO_4 8g/L。同时对实验室摇瓶条件下液体发酵的主要影响因素初始 pH、接种量等进行优化。在此优化条件下，耐酸性高温 α-淀粉酶活性达 3980U/ml，是未优化条件下的 2.1 倍（胡博等，2012）。通过正交试验对枯草芽胞杆菌 Y7 固体发酵培养基配方进行了优化，试验结果以麸皮 80%、稻壳 10%、玉米粉 5%、豆粕 5%、硫酸镁 0.05%、硫酸铵 0.5%、料水比为 1∶1.1 的配方活菌数最高，达 460 亿个/g，且应用于固体发酵罐中发酵效果良好（张志焱等，2005）。枯草芽胞杆菌培养基的组分是由葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、磷酸二氢钾、碳酸钙等 5 种原料构成，采用 L_1（4^5）正交表，将 5 种原料作为对枯草芽胞杆菌培养有影响的因素，通过试验数理统计的直观和理论分析，对其配方进行优化。试验结果表明，当培养基的配方为无水葡萄糖 3.50g/L、蛋白胨 0.83g/L、酵母膏 0.50g/L、磷酸二氢钾 0.35g/L 和碳酸钙 0.25g/L，温度（34±2）℃时，培养 16h 即可达生长峰值。由于枯草芽胞杆菌光密度（optical density，OD）与活菌数量的关系：$y=0.5182x^2+1.4462x+1.9714$（$r=0.996\ 343$），接种的枯草芽胞杆菌由 1.9714×10^8CFU/ml 提高到 3.3124×10^8CFU/ml。优化的枯草芽胞杆菌培养基条件能有效促进枯草芽胞杆菌生长（王妹等，2008）。从湛江近海海水和海泥分离的 229 株细菌中选出对芒果炭疽菌（*Colletotrichum gloeosporioides*）具有较强拮抗作用的海洋细菌菌株 BSW03，抑菌圈直径为 14.0mm。根据菌体形态、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析，菌株 BSW03 鉴定为枯草芽胞杆菌。从 9 种培养基中筛选出 BDPB 作为菌株 BSW03 的发酵培养基，通过单因素碳源、氮源试验和 L_9（3^4）正交试验对发酵培养基成分进行优化。结果表明：发酵培养基最佳配方为乳糖 20g/L、牛肉膏 15g/L、$K_2HPO_3\cdot3H_2O$ 0.75g/L，$MgSO_4$ 0.75g/L，pH 自然。转速 170r/min、温度 28℃的恒温摇床培养 3d 后的无菌发酵液抑菌效果最佳，抑菌圈直径为 27.3mm（张璐等，2011）。对从水产养殖环境中筛选出一株菌株 MM01 进行了鉴定和培养条件优化研究。结果显示：此菌株 MM01 能有效降低养殖水体中的氨氮和亚硝酸盐含量，经生理生化试验及 16S rDNA 测序鉴定其为枯草芽胞杆菌。单因素和正交试验结果显示：枯草芽胞杆菌 MM01 的最佳发酵培养基配方为玉米淀粉 18g/L、玉米浆 12g/L、NH_4Cl 6g/L、$MnSO_4\cdot H_2O$ 0.2g/L、KH_2PO_4 3g/L、$CaCl_2$ 0.2g/L、$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.2g/L（唐家毅等，2008）。为解决工业化生产中枯草芽胞杆菌活菌数量低、成本高的问题，通过正交试验、单因素试验和 100L 发酵罐中试，确定了枯草芽胞杆菌 HJ02 工业生产用的优化液体培养基和发酵工艺条件。最佳培养基配方为葡萄糖 10g/L、玉米粉 8g/L、豆粕 25g/L、硫酸锰 30.8mg/L、硫酸镁 5g/L、磷酸二氢钠 0.52g/L、磷酸氢二钠 2.33g/L；最优发酵工艺条件为培养温度 30℃，初始 pH7.0；最佳接种菌龄是 18h。细菌浓度达 7.19×10^9 个/ml（卢耀俊等，2008）。为得到益生芽胞杆菌 MA139 产芽胞的最佳培养基，以摇瓶发酵的方法，用 Plackett-Burman

设计从 11 种原料中筛选出 4 种对芽胞产量有显著影响的因素，即玉米粉、大豆粉、蛋白胨和 $MnSO_4·H_2O$。然后针对这 4 个主要因素，用最陡爬坡试验及中心组合设计优化产芽胞的最佳培养基。结果表明，当培养基的配方为玉米粉 3.17g/L、大豆粉 5.80g/L、蛋白胨 3.62g/L、$MnSO_4·H_2O$ 1.06g/L、葡萄糖 5g/L、尿素 3g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1.5g/L 和 KH_2PO_4 3g/L 时，菌株 MA139 发酵 36h 细菌总数可以从 $8.32×10^8$CFU/ml 提高到 $3.10×10^9$CFU/ml，芽胞率达 96%。试验表明，通过统计优化培养条件可以有效提高菌株 MA139 产芽胞的得率（郭小华等，2006）。用均匀设计法对枯草芽胞杆菌 ZB-6 的发酵培养基进行了优化，最佳培养基配方为：在每升培养液中，蔗糖 4.82g、牛肉膏 3.15g、黄豆饼粉 11.01g、硝酸铵 5.21g、磷酸氢二钾 5.04g、磷酸二氢钾 2.84g。优化验证试验结果为 $6.7×10^9$CFU/ml，明显高于原发酵培养基结果 $2.36×10^8$CFU/ml（赵健等，2007）。通过平板对峙、温室盆栽试验和田间小区试验，筛选到一株对玉米叶斑病（弯孢叶斑病、大斑病和小斑病）具有较好防效的细菌菌株 ST-87-14。温室盆栽试验显示其对玉米弯孢叶斑病的防治效果可达 100%，对玉米大斑病、玉米小斑病的防治效果分别达 83.30%和 87.60%。田间小区试验结果表明，菌株 ST-87-14 防治玉米弯孢叶斑病的效果达 52.04%，对玉米大斑病、玉米小斑病的防治效果分别达 43.56%和 48.16%。通过温室试验，证明菌株 ST-87-14 的菌体和胞外代谢产物都能对玉米叶斑病起到防病作用。通过 16S rDNA 序列测定和生理生化鉴定明确了菌株 ST-87-14 为枯草芽胞杆菌。通过对常见 11 种病原真菌的平板对峙培养，结果表明，菌株 ST-87-14 具有较广的抑菌谱。通过单因素试验，确定了菌株 ST-87-14 发酵培养基的最适碳源为蔗糖，最适氮源为豆饼粉。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化出该菌最适发酵培养基配方为蔗糖 30g/L、豆饼粉 2.0g/L、NaCl 1g/L、$CaCO_3$ 1g/L、KH_2PO_4 0.2g/L 和 $MgSO_4·7H_2O$ 0.3g/L（鹿秀云等，2006）。采用单因素及正交试验法对纳豆芽胞杆菌（*B. natto*）的摇瓶发酵培养基进行了优化，结果表明：优化后的培养基为酵母浸出汁 5g/L、蛋白胨 1g/L、蔗糖 12g/L、氯化钠 5g/L，并通过单因素实验法确定了最佳培养条件为温度 30℃、初始 pH7.0、接种量 3%、转速 200r/min、发酵时间 22h（吴胜莲等，2011）。采用单因素试验和正交试验法对筛选出的一株纳豆芽胞杆菌的液体发酵培养基和发酵工艺条件进行了优化。确定了最佳的培养基配方为蔗糖 2%、大豆蛋白胨 1%、硫酸铵 0.5%、Na_2HPO_4 0.1%、NaH_2PO_4 0.1%、$CaCl_2$ 0.02%、$MgSO_4$ 0.1%；最适发酵条件为发酵温度 37℃，初始 pH7.0，最适接种量 4%、装液量 100ml/500ml、转速 200r/min。进行了 50L 发酵罐放大培养，10h 达生长高峰期，最适放罐时间为 12h 左右，此时所获得的菌体数量约为 $6.0×10^{10}$CFU/ml（明飞平等，2009）。试验采用单因素法和响应面法对一株纳豆芽胞杆菌的液体发酵培养基和培养条件进行优化，最终培养基成分为蔗糖 29.42g/L、酵母粉 8.13g/L、柠檬酸钠 1.0g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.2g/L、K_2HPO_4 4.0g/L、KH_2PO_4 6.0g/L，初始 pH7.23；最佳培养条件为装液量 50ml/250ml、接种量 3%、发酵温度 40℃、转速 200r/min、发酵时间 11h，纳豆芽胞杆菌活菌数达 $7.5×10^9$CFU/ml（王莹莹等，2012）。

（9）蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）

为开发具有特定生理活性的新型微生态制剂，以益生菌蜡状芽胞杆菌为初发菌株，对蜡状芽胞杆菌的初发菌株进行了耐受性试验，其耐受性结果为：pH4.8，胆盐浓度（*w/V*）0.01%，温度 48℃。然后对蜡状芽胞杆菌的初发菌株通过紫外线诱变，筛选出能够适应

肠道生存环境、耐受胆盐和高温的优良菌株，其极限耐受条件为：pH4.2，胆盐浓度0.045g/100ml，温度 55℃。通过单因素试验和正交试验确定了蜡状芽胞杆菌发酵培养基的最佳配比（*w*/*V*）为：葡萄糖 1.0%，豆粕 3.0%，玉米浆 0.3%。对诱变后的菌株进行了生长曲线的测定，并通过生理生化实验对筛选出来的菌株进行鉴定（江敏和梁金钟，2006）。对蜡状芽胞杆菌 DLSL-2 深层液体发酵的主要影响因子温度、转速、初始 pH 等进行了单因素实验探讨，确定了最佳培养条件：温度为 30℃、转速为 250r/min、初始 pH 为 7.0。并用均匀设计法对其发酵培养基进行了优化，优化验证试验结果为 7.1×10^9CFU/ml，明显高于原发酵培养基结果 3.2×10^9CFU/ml（李野等，2005）。通过单因素试验探讨蜡状芽胞杆菌的摇瓶发酵条件（初始 pH、培养温度、转速和接种量等）对生长量的影响。确定最佳培养条件为初始 pH7.2，培养温度 25℃，转速 250r/min，接种量 7%。通过单因素和正交试验确定蜡状芽胞杆菌发酵培养基的最佳配比（*w*/*V*）为：可溶性淀粉 3.0%、豆饼粉 2.0%、磷酸氢二钾 0.3%、$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.02%和 $CaCl_2$ 0.01%。筛选出的优化培养基活菌数为 5×10^8CFU/ml（周映华等，2007）。

（10）饲料类芽胞杆菌（*P. pabuli*）

碱性果胶酶生产菌 *P. pabuli* 菌株 WZ008 在种子培养基中生长具有自絮凝特性。种子液菌体形态及其对碱性果胶酶生产的影响结果表明，絮状种子有利于产酶。种子培养基的优化结果表明，添加可溶性淀粉和 β-环糊精有利于维持自絮凝形态，同时生物量和发酵产酶水平得到提高；种子培养基初始 pH 偏碱性对自絮凝形态及产酶水平有显著影响，添加 pH 缓冲盐 K_2HPO_4 进一步稳定了自絮凝形态。种子培养基优化后，在 5L 罐中碱性果胶酶产量达 90U/ml（魏春等，2013）。

（11）嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）

以菌体生长量和 pH 作为培养基优化的指标，对嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌 CHB1 发酵培养基成分进行了筛选与优化。结果表明，不同碳氮源对发酵液菌数影响相差较大，最佳培养基配比为牛肉膏、大豆蛋白胨、NaCl、K_2HPO_4 和 KH_2PO_4；最佳摇瓶发酵配方为牛肉膏 0.5%、大豆蛋白胨 0.9%、NaCl0.2%、K_2HPO_4∶KH_2PO_4 为 0.1%∶0.075%，该培养基中菌株 CHB1 比在发酵基础培养基中培养菌量提高 10 倍以上（任香芸等，2007）。筛选并优化嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌 CHB1 液体发酵培养基。通过 Plackett-Burman 设计和响应面法，确定培养基的主要影响因素和最佳浓度。利用 SAS 软件进行分析，确定对响应值影响最大的 3 个因素为豆粕、酵母粉、K_2HPO_4。最佳培养基组成为酵母粉 0.51%、豆粕 0.425%、K_2HPO_4 0.994%。根据模型预测得到的理论最大菌数为 2.94×10^8 CFU/ml。在初始条件下试验，菌数为 2.40×10^8 CFU/ml，在优化的最佳培养基条件下，实际的菌数为 3.06×10^8 CFU/ml。菌数比优化前提高了 27.3%。试验值与预测值的误差为 4.08%。实验值与模型预测值拟合良好（李活孙等，2009）。

（12）苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）

苏云金芽胞杆菌 HD-1 发酵中培养基的配方不仅影响发酵水平，还决定发酵产物杀虫毒力的效果。本试验在基础参数试验基础上，采用均匀设计法对 Bt 发酵中培养基组分、杀虫晶体蛋白纯化条件进行优化，并直接采用发酵中伴胞晶体量作为最终评价指标。结果表明：Bt 培养基成分对发酵的主要影响因素依次为 $MgSO_4$、蛋白胨、可溶性淀粉，最

佳用量为 1.3g/L、2.6g/L、4.5g/L；晶体蛋白双液相纯化的主要影响因素依次为 K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 质量比、PEG 浓度、沉淀量、离心速度，最佳条件为 3∶1、110g/L、1g、1440r/min，其中离心速度若选 500r/min，可能对晶体纯度提高更有利，但低速对回收率有负影响（王善利等，2006）。为获取苏云金芽胞杆菌培养基的最优配方，即玉米淀粉、黄豆饼粉、酵母粉、蛋白胨和鱼粉等的最佳配比，运用二次正交回归旋转组合设计安排试验。基于试验数据、背景知识和遗传算法的原理，进一步设计了搜索 Bt 培养基最优配方的算法，通过该算法搜索出该菌发酵培养基配方的最优解区间（刘雄恩等，2008）。对来自武夷山国家自然保护区非耕作区的 200 个土壤样品进行了苏云金芽胞杆菌的分离，获得 12 株菌株，分离频率为 6.0%。室内感染力测定结果表明，菌株 WB9 菌株对小菜蛾具有高感染力、对甜菜夜蛾具有较高的感染力；生理生化指标测定结果显示菌株 WB9 与库斯塔克亚种 8010 的反应表现型相同，菌株 WB9 可能属库斯塔克亚种。此外，通过正交试验设计和室内摇瓶培养，获得了优化的菌株 WB9 工业培养基组合，即 30.0g/L 玉米淀粉、20.0g/L 黄豆饼粉、15.0g/L 玉米粉、10.0g/L 酵母粉、2.0g/L 蛋白胨、15.0g/L 玉米浆、5.0g/L $CaCO_3$、0.3g/L $MgSO_4·7H_2O$、1.0g/L KH_2PO_4 和 0.02g/L $ZnSO_4·7H_2O$（黄勤清等，2006）。对苏云金芽胞杆菌的培养基配方进行室内摇瓶优化筛选，首先用摇瓶培养筛选到Ⅱ号培养基，在此配方的基础上，将培养基组分划分为氮源、碳源及无机盐三因素，采用三因素二水平正交旋转组合设计的方法进行培养基优化组合研究，建立其芽胞产量依氮源、碳源、无机盐的呼应方程。借助此方程获得响应最佳点，即培养基各组分的最佳配比。试验结果表明，该方法也是苏云金芽胞杆菌培养基优化中十分简便、实用、快速的途径（关雄等，1998）。此外，对苏云金芽胞杆菌间歇发酵进行了研究，提出了利用味精废水培养苏云金芽胞杆菌进而生产 Bt 生物农药的新的味精废水处理方法。对苏云金芽胞杆菌在味精废水中培养的培养基优化、深层培养条件及深层培养过程各参数的变化规律等进行了较为系统的研究，提出了进行工业化试验的培养工艺（郑舒文等，2001）。优化苏云金芽胞杆菌 B28 培养基，提高晶体蛋白产量。采用 SAS 软件设计 Plackett-Burman 试验，得到影响晶体蛋白含量的显著因素。根据选出的显著因素设计最陡爬坡试验，确定晶体蛋白含量最高的中心点。根据确定的显著因素和中心点设计响应面法分析试验。最佳培养基配比：牛肉膏 4.00g/L、蛋白胨 10.00g/L、葡萄糖 3.00g/L、NaCl 4.60g/L、K_2HPO_4 0.67g/L、$MgSO_4$ 0.30g/L、$MnSO_4$ 0.05g/L。优化后的 B28 晶体蛋白产量提升了 43.5%（刘坤等，2011）。采用正交试验方法，进行摇瓶发酵培养基筛选试验来优化苏云金芽胞杆菌发酵培养基，通过测量发酵液吸光度值来确定不同农副产品培养基成分对苏云金芽胞杆菌发酵的影响，从而使培养基优化过程简单易行。试验结果表明，不同培养基成分配比对发酵效果影响差别很大，试验所得的最佳培养基组合为玉米粉 2.0%、豆饼粉 3.5%、鱼粉 2.0%、花生饼粉 2.0%、淀粉 1.0%、K_2HPO_4 0.3%、$CaCO_3$ 0.3%（高鹤永等，2004）。

（13）特基拉芽胞杆菌（*B. tequilensis*）

采用响应面优化法对一株野生特基拉芽胞杆菌（*B. tequilensis* CGX5-1）的发酵培养基进行优化，最终培养基各组分为大麦粉 68.4g/L、玉米粉 40g/L、豆饼粉 61.1g/L、KH_2PO_4 1g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.1g/L、$CaCl_2$ 0.1g/L。用优化培养基在 37℃摇瓶发酵 52h，β-1,3-1,4-葡聚糖酶酶活达 191.96U/ml，是优化前产酶水平的 1.91 倍（刘晓玲等，2013）。

（14）长野芽胞杆菌（*B. naganoensis*）

利用基因工程手段获得的产长野芽胞杆菌普鲁兰酶的枯草芽胞杆菌基因工程菌株WB600/pWB-pulB，通过单因素筛选及正交试验进行发酵培养基优化，得到产酶最佳配方为玉米淀粉 3.0%、酵母膏 2.0%、$CaCl_2$ 0.03%、Na_2HPO_4 1.0%。同时对重组菌株摇瓶条件下液体发酵的主要影响因素初始 pH、接种量、装液量、转速、温度等进行探讨，确定了产酶最佳培养条件为，以 3%接种量接种于优化后培养基，初始 pH7.0，装液量30ml/250ml，37℃，200r/min 摇床培养 36h。在此优化条件下，普鲁兰酶活性达 20.16U/ml，是之前研究结果（10.94U/ml）的 1.84 倍（刘逸寒等，2011）。

二、芽胞杆菌缺素培养

1. 概述

碳源物质是芽胞杆菌的重要营养物质。凡是可以被微生物利用，构成细胞代谢产物碳素来源的物质，统称为碳源物质。碳源物质通过细胞内的一系列化学变化，被微生物用于合成各代谢产物。微生物对碳素化合物的需求是极为广泛的，根据碳素的来源不同，可将碳源物质分为无机碳源物质和有机碳源物质。糖类是较好的碳源，尤其是单糖（葡萄糖、果糖），双糖（蔗糖、麦芽糖、乳糖），绝大多数都能被微生物利用。此外，简单的有机酸、氨基酸、醇、醛、酚等含碳化合物也能被许多微生物利用。因此在制作培养基时常加入葡萄糖、蔗糖作为碳源。淀粉、果胶、纤维素等，这些有机物质除在细胞内分解代谢提供小分子碳架外，还产生供合成代谢需要的能量，所以部分碳源物质既是碳源物质，同时又是能源物质。在微生物发酵工业中，常根据不同微生物的需要，利用各种农副产品如玉米粉、米糠、麦麸、马铃薯、甘薯以及各种野生植物的淀粉，作为微生物生产廉价的碳源。这类碳源往往包含了几种营养要素。

氮源物质是芽胞杆菌的重要营养物质。微生物细胞中含氮 5%～13%，它是微生物细胞蛋白质和核酸的主要成分。氮素对微生物的生长发育有着重要的意义，微生物利用它在细胞内合成氨基酸和碱基，进而合成蛋白质、核酸等细胞成分，以及含氮的代谢产物。无机氮源物质一般不提供能量，只有极少数的化能自养型细菌如硝化细菌可利用铵态氮和硝态氮提供氮源的同时，通过氧化产生代谢能。微生物营养上要求的氮素物质可以分为 3 个类型：①空气中分子态氮，只有少数具有固氮能力的微生物（如自生固氮菌、根瘤菌）能利用；②无机氮化合物，如铵态氮（NH_4^+）、硝态氮（NO_3^-）和简单的有机氮化物（如尿素），绝大多数微生物可以利用；③有机氮化合物，大多数寄生性微生物和一部分腐生性微生物需以有机氮化合物（蛋白质、氨基酸）为必需的氮素营养。在实验室和发酵工业生产中，人们常以铵盐、硝酸盐、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、鱼粉、血粉、蚕蛹粉、豆饼粉、花生饼粉作为微生物的氮源。

为了研究芽胞杆菌对营养元素的需求，缺素培养提供缺氮或者缺碳的生长环境，观察芽胞杆菌对营养环境的适应性，筛选适应于微生物发酵床应用的芽胞杆菌，要求在缺碳或者缺氮的条件下可以生长，缺素培养提供筛选方式。

2. 研究方法

从微生物发酵床养猪垫料中采集样品，分离出 4 种芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6（枯草芽胞杆菌）、*B. coagulans* Lp-6（凝结芽胞杆菌）、*B. laevolacticus* Y-4-11（左旋乳酸芽胞杆菌）、*P. macerans* Y-4-12（浸麻类芽胞杆菌）。培养基配制：碳源利用研究中的培养基组分：（NH_4）$_2SO_4$ 2.0g、$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.5g、K_2HPO_4 0.5g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g，用蒸馏水溶解，并定容至 1000ml，分装至 150ml 容量瓶中，每瓶 100ml，往各瓶中加入葡萄糖 0g、0.25g、0.5g、1g，即糖的浓度分别为 0%、0.25%、0.5%、1%，设 3 次重复。氮源利用研究中的培养基组分：KH_2PO_4 1.36g、Na_2HPO_4 2.13g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5g、葡萄糖 10g，用蒸馏水溶解，并定容至 1000ml，分装至 150ml 容量瓶中，每瓶 100ml，往各瓶中加入 KNO_3 0g、0.025g、0.05g、0.1g，即氮的浓度分别为 0%、0.025%、0.05%、0.1%，设 3 次重复。①芽胞杆菌活化，将 4 类芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6、*B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 在 NA 平板上活化，接种于 LB 液体培养基中，培养 24h；②接种菌液制备，制备上述 4 类芽胞杆菌的菌液稀释至相同含菌量；③碳浓度的影响，将含不同浓度糖的培养基分装至试管中，10ml/管，再接入 0.1ml 的菌液；④氮浓度的影响，将含不同浓度氮的培养基分装至试管中，10ml/管，再接入 0.1ml 的菌液；⑤生长量检测，30℃培养，3d 后，将氮源利用研究的各样品进行混浊度比较（测定 OD_{600}），7d 后，将碳源利用研究的各样品进行混浊度比较（测定 OD_{600}）。

3. 碳素对芽胞杆菌生长的影响

实验结果见表 1-4，从表中可看出 *B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 两类芽胞杆菌在不同糖浓度下 OD 值相差不大，在糖浓度为 0%时和 1%时 OD_{600} 值基本相同，说明缺碳条件下，*B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 两类芽胞杆菌能很好地生长。而 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两类芽胞杆菌在不同的糖浓度下 OD_{600} 值相差较大，在 0%的糖浓度下，*B. laevolacticus* Y-4-11 的 OD_{600} 值为 0.062，*P. macerans* Y-4-12 的 OD_{600} 值为 0.077，低于其在 1%糖浓度下的 OD_{600} 值，说明在缺碳条件下，菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 生长不好或不能生长（图 1-33～图 1-36）。

表 1-4　4 株芽胞杆菌在不同糖浓度下生长的 OD_{600} 值测定

菌名	OD_{600} 测定值			
	0%浓度的糖	0.25%浓度的糖	0.5%浓度的糖	1%浓度的糖
B. subtilis B-6-6	0.126	0.181	0.188	0.124
B. coagulans Lp-6	0.117	0.172	0.137	0.124
B. laevolacticus Y-4-11	0.062	0.060	0.080	0.142
P. macerans Y-4-12	0.077	0.072	0.073	0.119

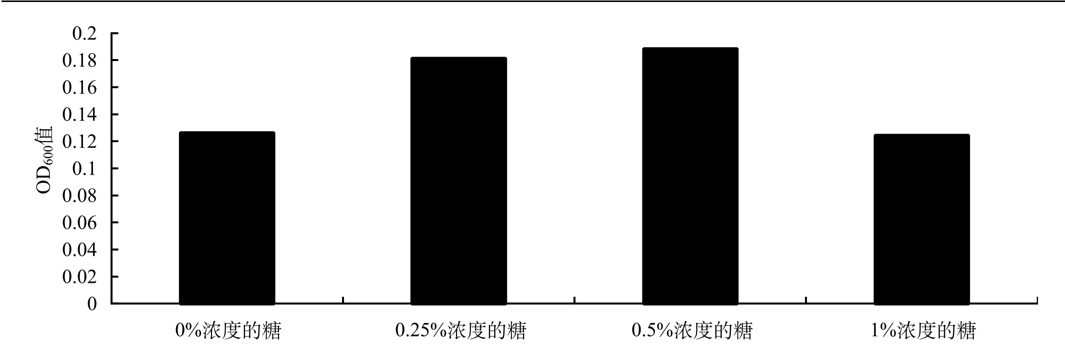


图 1-33　碳源对 *B. subtilis* B-6-6（枯草芽胞杆菌）生长的影响

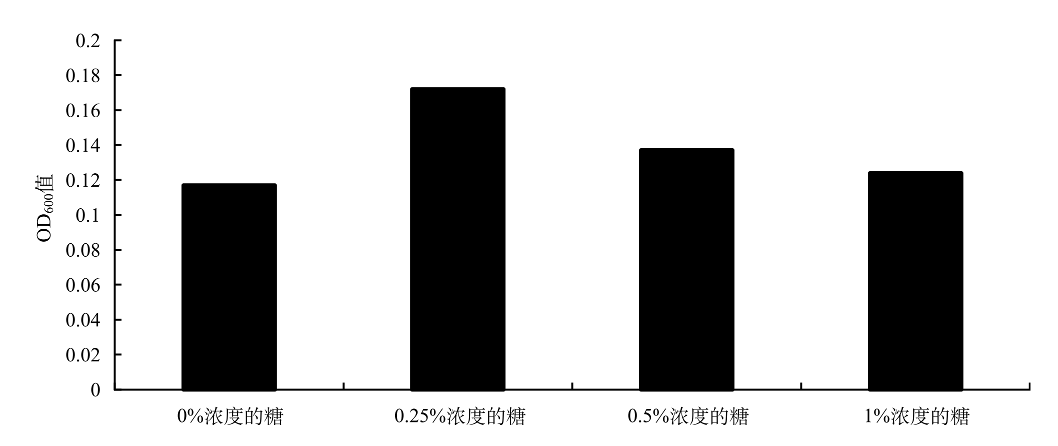


图 1-34　碳源对 *B. coagulans* Lp-6（凝结芽胞杆菌）生长的影响

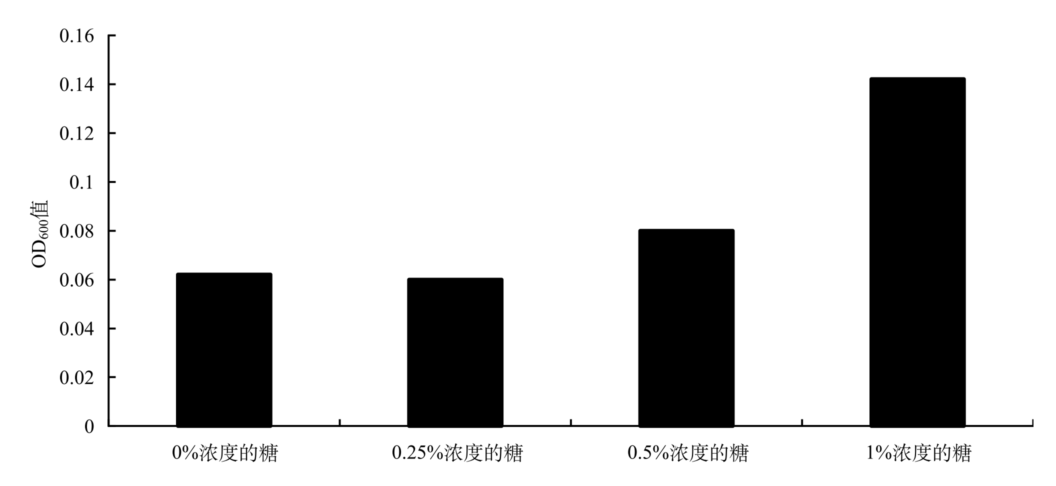


图 1-35　碳源对 *B. laevolacticus* Y-4-11（左旋乳酸芽胞杆菌）生长的影响

4. 氮素对芽胞杆菌生长的影响

对氮源利用的实验结果见表 1-5，从表中可以看出，菌株 *B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 的 OD_{600} 值随着氮浓度的升高而增大，*B. subtilis* B-6-6 菌株在 0.1%氮浓

度下的 OD_{600} 值是它在 0% 氮浓度下的 OD_{600} 值的 5 倍（图 1-37），*B. coagulans* Lp-6 菌株在 0.1% 氮浓度下的 OD_{600} 值是它在 0%氮浓度下的 OD_{600} 值的 4.66 倍（图 1-38），说明菌株 *B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 在缺氮条件下生长不好或不能生长。

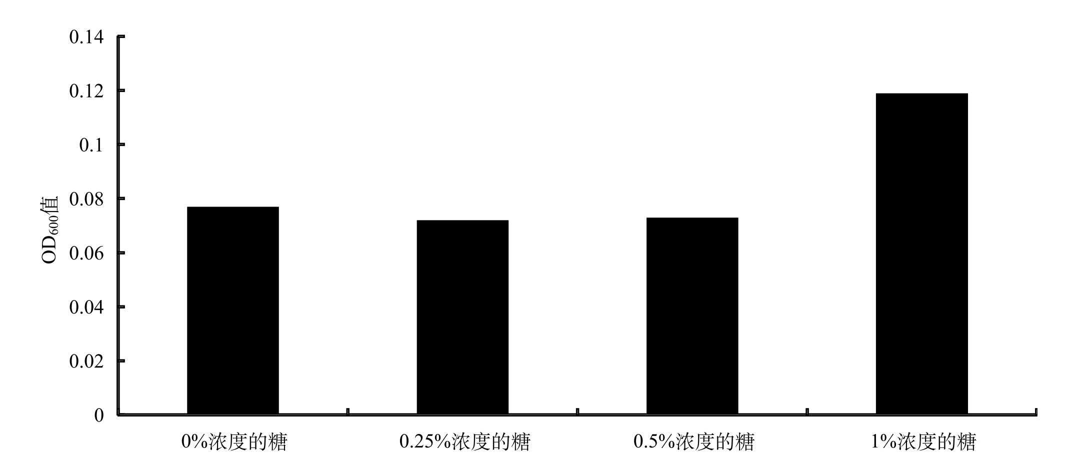


图 1-36　碳源对 *P. macerans* Y-4-12（浸麻类芽胞杆菌）生长的影响

表 1-5　4 株芽胞杆菌在不同氮浓度下生长的 OD_{600} 值测定

菌名	OD_{600} 测定值			
	0%浓度的氮	0.025%浓度的氮	0.05%浓度的氮	0.1%浓度的氮
B. subtilis B-6-6	0.052	0.080	0.105	0.260
B. coagulans Lp-6	0.143	0.186	0.324	0.666
B. laevolacticus Y-4-11	0.173	0.243	0.188	0.201
P. macerans Y-4-12	0.306	0.475	0.415	0.424

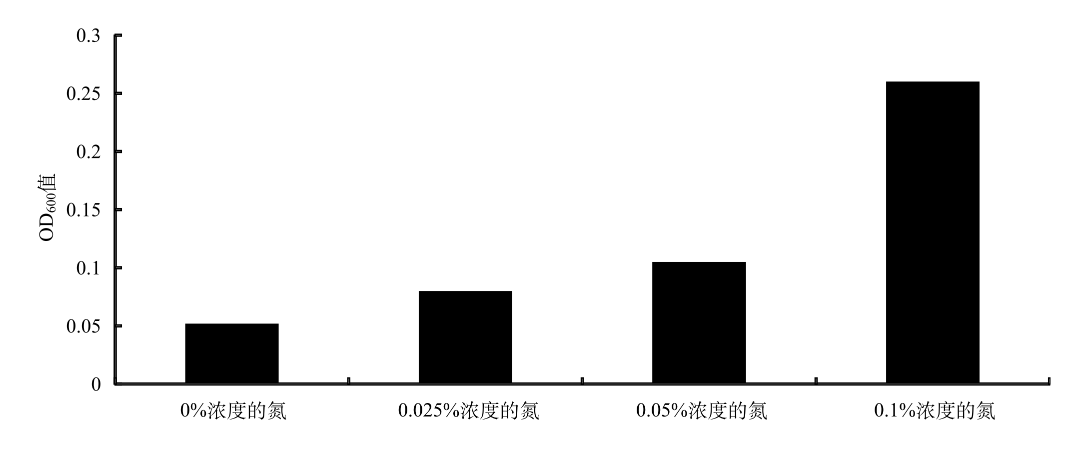


图 1-37　氮源对 *B. subtilis* B-6-6（枯草芽胞杆菌）生长的影响

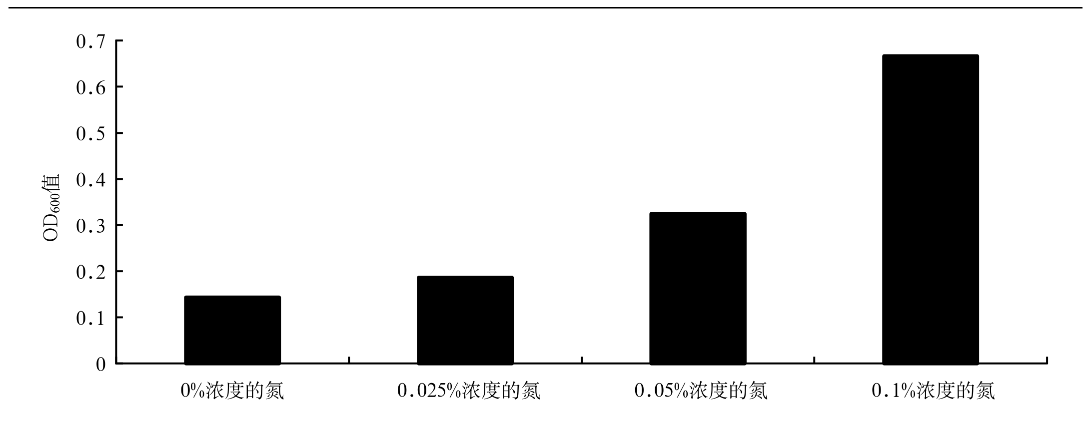


图 1-38　氮源对 *B. coagulans* Lp-6（凝结芽胞杆菌）生长的影响

在缺氮条件下，菌株 *B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 生长不好或不能生长，而菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 能很好地生长。菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 的 OD_{600} 值在不同氮浓度下相差不大，在 0.1%氮浓度下的 OD_{600} 值和 0% 氮浓度下的 OD_{600} 值相差甚微，说明菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11（图 1-39）和 *P. macerans* Y-4-12（图 1-40）在缺氮条件下能很好地生长。

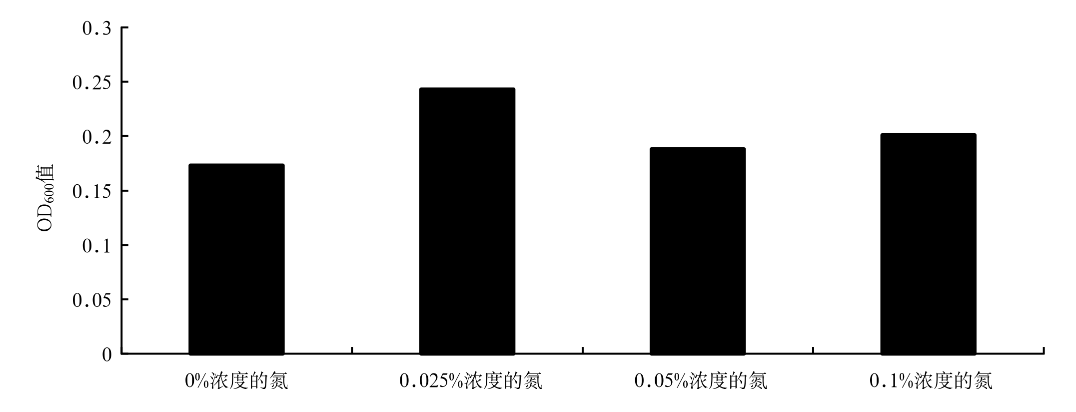


图 1-39　氮源对 *B. laevolacticus* Y-4-11（左旋乳酸芽胞杆菌）生长的影响

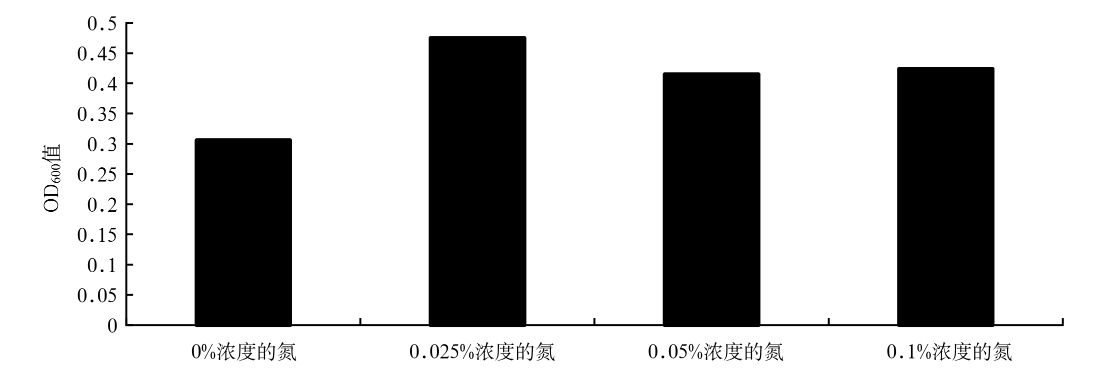


图 1-40　氮源对 *P. macerans* Y-4-12（浸麻类芽胞杆菌）生长的影响

三、芽胞杆菌培养基碳氮元素优化

1. 概述

以短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis* JK-2）为例，研究培养基碳氮元素优化。福建省农业科学院农业微生物研究室从枯萎病发生田块健株根际分离得到的一株具有拮抗作用的生防细菌，经鉴定为短短芽胞杆菌。该菌对番茄枯萎病菌的盆栽防效和田间防效分别为 83.82%和 74.70%，能抑制枯萎病菌菌丝的生长，可造成菌丝消解，产生泡状物，破坏生长点，引起细胞内含物外溢。并从发酵液中分离出分子质量约为 4.1kDa 的活性肽和胞外多糖两种抑菌物质。抑菌物质的产生不仅与菌株本身的特性有关，也与其所处的环境条件有关，因此菌株的发酵技术成为关键，而培养基的营养配方不仅影响菌体的生长，同时影响抑菌物质的生成。菌体生长的最佳条件不一定是抑菌物质生成的最好条件。作者在兼顾菌株的生长量和抗菌物质的产生量两项指标基础上，运用正交设计和单因素试验方法对短短芽胞杆菌 JK-2 培养基组分进行了优化，旨在确定该菌株抑菌活性最佳时摇瓶培养的方案，并为生产发酵提供参考。

2. 研究方法

活性指示菌菌株为番茄枯萎病病原菌 ZJUF-20031，由浙江大学生物技术研究所章初龙老师惠赠。碳氮营养成分配比：采用正交试验设计，选择酵母粉、蛋白胨、蔗糖、牛肉浸膏、可溶性淀粉 5 个培养基组分因素，每个因素设定 3 个水平，同时考虑蛋白胨和牛肉浸膏、蔗糖和可溶性淀粉的相互作用。采用 L_{18}（3^7）正交表（表 1-6），随机安排因素和配比水平。摇瓶培养：按正交试验设计表分别配置培养基，pH7.2 左右。

表 1-6　L_{18}（3^7）正交试验因素水平

水平	碳氮元素用量/%				
	A	B	C	D	E
1	0.3	0.5	2.0	1.0	0.5
2	1.0	0.3	0.5	0.0	0.1
3	0.5	0.0	1.0	0.5	1.2

注：A. 蛋白胨；B. 牛肉浸膏；C.蔗糖；D. 可溶性淀粉；E. 酵母粉

将活化培养好的菌株调成 1×10^7CFU/ml 浓度的芽胞悬浮液，分别吸 1.0ml 到盛有 25ml 不同碳源营养成分配比的液体发酵培养基中，于 30℃，170r/min 振荡培养 48h。活性指示菌番茄枯萎菌用 PDB 培养基培养 3d 后，配成浓度为 1×10^7CFU/ml 的芽胞悬浮液，吸 1ml 到熔化并冷却为 45℃左右的 6ml PDA 培养基（PDA 培养基：马铃薯 200.0g/L、葡萄糖 20.0g/L、琼脂 17.0g/L）中，混匀，倾倒在已凝固的 PDA 平板上。待上层培养基冷却凝固后，在平板上打孔（直径为 6mm），每孔加待测液 40μl，处理后的平板置于 28℃恒温培养箱内培养 36h 后观察抑菌情况及抑菌圈大小，研究不同碳源营养成分培养的短短芽胞杆菌 JK-2 对

番茄枯萎菌的抑菌能力，筛选出该菌株发挥最好抑菌效果的基础培养基。

3. 短短芽胞杆菌 JK-2 对碳氮源的营养需求

从表 1-7 和表 1-8 的方差分析可以看出，牛肉浸膏、酵母粉、蔗糖对短短芽胞杆菌 JK-2 菌株发酵液的抑菌活性有显著影响。蛋白胨和牛肉浸膏、蔗糖和可溶性淀粉的交互作用对其抑菌活性的影响不明显。而蛋白胨、可溶性淀粉对发酵液抑菌活性的影响比较弱。蔗糖是培养基中的主要碳源，蔗糖含量增大，发酵液抑菌活性也随之提高。可溶性淀粉作为另外一种碳源，当质量分数为 0.5%时，抑菌圈平均值为 11.933mm，优于质量分数为 0%和 1%时。说明淀粉对发酵液抑菌活性有一定影响，但含量比例需严格控制。

表 1-7　L_{18}（3^7）正交试验设计和结果

处理	A	B	A×B	C	D	C×D	E	抑菌圈直径/mm	菌体数/(×10^8/ml)
1	1（0.3）	1（0.5）	1	1（2.0）	1（1.0）	1	1（0.5）	13.00	5.68
2	1（0.3）	2（0.3）	2	2（0.5）	2（0.0）	2	2（0.1）	11.00	3.92
3	1（0.3）	3（0.0）	3	3（1.0）	3（0.5）	3	3（1.2）	11.25	1.58
4	2（1.0）	1（0.5）	1	2（0.5）	2（0.5）	3	3（1.2）	10.75	1.42
5	2（1.0）	2（0.3）	2	3（1.0）	3（1.0）	1	1（0.5）	12.60	4.96
6	2（1.0）	3（0.0）	3	1（2.0）	1（0.0）	2	2（0.1）	11.00	2.96
7	3（0.5）	1（0.5）	2	1（2.0）	3（0.5）	2	3（1.2）	12.25	3.92
8	3（0.5）	2（0.3）	3	2（0.5）	1（1.0）	3	1（0.5）	11.00	3.10
9	3（0.5）	3（0.0）	1	3（1.0）	2（0.0）	1	2（0.1）	10.00	4.36
10	1（0.3）	1（0.5）	3	3（1.0）	2（1.0）	2	1（0.5）	13.25	2.44
11	1（0.3）	2（0.3）	1	1（2.0）	3（0.0）	3	2（0.1）	12.00	5.96
12	1（0.3）	3（0.0）	2	2（0.5）	1（0.5）	1	3（1.2）	9.50	4.72
13	2（1.0）	1（0.5）	2	3（1.0）	1（0.0）	3	2（0.1）	12.00	0.44
14	2（1.0）	2（0.3）	3	1（2.0）	2（0.5）	1	3（1.2）	11.00	5.68
15	2（1.0）	3（0.0）	1	2（0.5）	3（1.0）	2	1（0.5）	11.50	4.00
16	3（0.5）	1（0.5）	3	2（0.5）	3（0.0）	1	2（0.1）	12.00	3.10
17	3（0.5）	2（0.3）	1	3（1.0）	1（0.5）	2	3（1.2）	11.00	4.80
18	3（0.5）	3（0.0）	2	1（2.0）	2（1.0）	3	1（0.5）	11.50	5.90
K_1	70.00	73.25	68.25	70.75	67.50	68.10	72.85		
K_2	68.85	68.60	68.85	65.75	67.50	70.00	68.00		
K_3	67.75	64.75	69.50	70.10	71.60	68.50	65.75		
均值 1	11.67	12.21	11.38	11.79	11.25	11.35	12.14		
均值 2	11.48	11.43	11.48	10.96	11.25	11.67	11.33		
均值 3	11.29	10.79	11.58	11.68	11.93	11.42	10.96		
R	0.48	1.80	0.27	1.06	0.87	0.40	1.51		

注：A. 蛋白胨；B. 牛肉浸膏；C.蔗糖；D. 可溶性淀粉；E. 酵母粉；括号内为用量

表 1-8　$L_{18}(3^7)$ 正交试验方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	备注
A	0.422	2	0.211	2.0690	$F_{0.05}(2,3)=9.55$
B	6.039	2	3.019	29.617	$F_{0.1}(2,3)=5.46$
A×B	0.130	2	0.065	0.6390	
C	2.464	2	1.232	12.083	
D	1.868	2	0.934	9.1610	
C×D	0.334	2	0.167	1.6400	
E	4.389	2	2.194	21.525	
误差	0.306	3	0.102		
总计	15.951				

注：A. 蛋白胨；B. 牛肉浸膏；C.蔗糖；D. 可溶性淀粉；E. 酵母粉

4. 短短芽胞杆菌 JK-2 碳氮源营养交互作用

蛋白胨和牛肉浸膏的交互作用、蔗糖和可溶性淀粉的交互作用均不显著。分别说明两者是在独立起作用，不能相互替代。从试验结果和上述分析中可以看出，高抑菌活性培养基的最佳配方为 10 号，其组分编号为 $A_1B_1C_3D_2E_1$，即蛋白胨 0.3%、牛肉浸膏 0.5%、蔗糖 1.0%、可溶性淀粉 1.0%、酵母粉 0.5%。同时试验将菌体数作为参考指标来考虑。从表 1-7 可以看出菌体数与发酵液的抑菌活性并不呈正相关。例如，抑菌活性最强的 10 号培养基，其菌体数只达 2.44×10^8CFU/ml。从菌株的生长量和抗菌物质的产生量两项指标来综合考虑，1 号培养基为最佳配方，其组分编号为 $A_1B_1C_1D_1E_1$，即蛋白胨 0.3%、牛肉浸膏 0.3%、蔗糖 2.0%、可溶性淀粉 1.0%、酵母粉 0.5%。

四、芽胞杆菌培养基矿质元素优化

1. 概述

微生物细胞中的矿质元素占干重的 3%～10%，它是微生物细胞结构物质不可缺少的组成成分和微生物生长不可缺少的营养物质。许多无机矿质元素构成酶的活性基团或酶的激活剂；并具有调节细胞的渗透压、调节酸碱度和氧化还原电位，以及能量的转移等作用。微生物需要的无机矿质元素分为常量元素和微量元素。常量矿质元素是磷、硫、钾、钠、钙、镁、铁等。磷、硫的需要量很大，磷是微生物细胞中许多含磷细胞成分，如核酸、核蛋白、磷脂、腺苷三磷酸（ATP）、辅酶的重要元素。硫是细胞中含硫氨基酸、生物素、硫胺素等辅酶的重要组成成分。钾、钠、镁是细胞中某些酶的活性基团，并具有调节和控制细胞质的胶体状态、细胞质膜的通透性和细胞代谢活动的功能。微量元素有钼、锌、锰、钴、铜、硼、碘、镍、溴、钒等，一般在培养基中含有 0.1mg/L 或更少就可以满足需要。本研究以短短芽胞杆菌（*B. brevis* JK-2）为例，研究培养基矿质元素优化。

2. 研究方法

分别吸 1.0ml 上述短短芽胞杆菌 JK-2 悬浮液到盛有 25ml 含基础培养基和不同矿质营养成分配比的液体发酵培养基中，于 30℃，170r/min 振荡培养 48h。活性指示菌番茄枯萎菌的芽胞悬浮液制备和抑菌圈的实验方法同上。研究不同矿物质营养成分培养的短短芽胞杆菌 JK-2 对番茄枯萎菌的抑菌能力，结合基础培养基筛选出该菌株发挥最好抑菌效果的培养基。采用 DPS 软件对实验数据进行方差分析。矿物营养成分配比：在上述筛选得到的基础培养基（含不同配比的蛋白胨、牛肉浸膏、蔗糖、可溶性淀粉、酵母粉等 5 种营养成分）中加入含 $CaCl_2$、$MgSO_4$、K_2HPO_4、NaCl 等不同质量组合的无机盐（表 1-9），高压灭菌后备用。短短芽胞杆菌 JK-2 菌株对矿物质的营养需求：利用三水平正交试验考察蔗糖、可溶性淀粉、牛肉浸膏、蛋白胨、酵母粉对短短芽胞杆菌 JK-2 抑菌活性的影响，利用极差分析找出了主要影响因子并得出最佳基础培养基配方：蔗糖 2.0%、牛肉浸膏 0.5%、蛋白胨 0.3%、可溶性淀粉 1.0%、酵母粉 0.5%。在此基础上加入不同质量配比的 K_2HPO_4、NaCl、$CaCl_2$、$MgSO_4$ 等无机盐进行单因素试验，考察这些无机盐对短短芽胞杆菌 JK-2 产抑菌活性物质的作用，以进一步优化培养基配方。

表 1-9　无机盐的不同配比组合

水平	因素/%			
	K_2HPO_4	NaCl	$CaCl_2$	$MgSO_4$
1	0	0	0	0
2	0.25	0	0	0
3	0	0.5	0	0
4	0	0	0.5	0
5	0	0	0	0.075
6	0	0.5	0.5	0
7	0.25	0	0	0.075
8	0	0	0.5	0.075
9	0.25	0	0.5	0
10	0.25	0	0.5	0.075
11	0.25	0.5	0.5	0.075

3. 短短芽胞杆菌 JK-2 对矿物质的营养需求

试验结果表明（表 1-10），加入无机盐（NaCl 除外）能够大大促进短短芽胞杆菌 JK-2 产抑菌活性物质的能力。其中 4 号和 7 号培养基的促进作用最明显，抑菌圈平均直径分别达 24.87mm 和 24.62mm。不加无机盐和加入 NaCl 的培养基的效果最差，抑菌圈平均直径都是 13.50mm。另外，同时加入 4 种无机盐培养基，致使短短芽胞杆菌 JK-2 发酵液失去了抑菌能力。通过正交及单因素试验，得出培养该生防菌的最适培养基配方：

蔗糖 2.0%、牛肉浸膏 0.5%、蛋白胨 0.3%、可溶性淀粉 1.0%、酵母粉 0.5%、$CaCl_2$ 0.5%。

表 1-10　无机盐对短短芽胞杆菌 JK-2 抑菌活性的影响

培养基编号	抑菌圈直径/mm	5%显著水平	1%极显著水平
1（CK）	13.50	c	C
2	18.80	b	B
3	13.50	c	C
4	24.87	a	A
5	20.00	b	B
6	20.00	b	B
7	24.62	a	A
8	19.25	b	B
9	18.75	b	B
10	20.00	b	B
11	0.00	d	D

五、讨论

短短芽胞杆菌作为一种潜在动植物的益生菌，研究其最佳的摇瓶发酵条件一方面可更准确地研究其抑菌效果，另一方面也为生产发酵提供参考。微生物发酵的营养，需要有碳源、氮源，以及 K、P、S、Mg 等矿物质和许多微量元素。但不同种及同种的不同菌株所需的营养成分会有差别，仅不同的短短芽胞杆菌就有各自的最适培养基，如陈凯等（2006）报道的短短芽胞杆菌 XDH 的最佳营养组分为：葡萄糖 1.5%、黄豆饼粉 3.0%、蛋白胨 0. 2%、NaCl 0.1%、$(NH_4)_2SO_4$ 0.5%、$CaCO_3$ 0.6%、$MgSO_4$ 0.6%，而陈莉等（2008）报道的短短芽胞杆菌 A57 的适宜培养基为 LB 培养基。研究对短短芽胞杆菌 JK-2 菌株的摇瓶培养配方进行了优化，获得了菌株抑菌活性最佳时的摇瓶发酵配方为：蔗糖 2.0%、牛肉浸膏 0.5%、蛋白胨 0.3%、可溶性淀粉 1.0%、酵母粉 0.5%、$CaCl_2$ 0.5%。

培养基中牛肉浸膏不仅是重要的氮源，而且含有多肽、氨基酸、有机酸、糖类、矿物质营养和维生素等，其含量变化能大大影响发酵液抑菌活性。酵母粉作为氮源，同时也是多种维生素的重要来源。研究表明氮源对短短芽胞杆菌 JK-2 发酵液抑菌活性的影响大于碳源。微生物需要的矿物质常用硫酸镁（供给 Mg 和 S）和磷酸钾（供给 K 和 P）。研究表明在基础培养基中同时加入 K_2HPO_4、$MgSO_4$ 及单独加入 $CaCl_2$ 时，短短芽胞杆菌 JK-2 发酵液的抑菌能力都大大提高。同时加入这 3 种盐时，抑菌效果也比较好。但在此基础上再加入 NaCl，即 4 种无机盐并存时，短短芽胞杆菌 JK-2 发酵液丧失了抑菌活性。推测可能存在的原因包括抗菌肽构象改变、分泌抑菌物质的系统受到遏制等。对此现象的解释尚待进一步研究。

另外，如果该菌要进行工业生产发酵还要考虑营养对菌株芽胞产量的影响。芽胞是细菌在生长后期形成的休眠体，能抵抗不良环境。因此，芽胞的形成对产品的保存期及

施入土壤后在植株根际定殖和与其他微生物间的相互竞争中具有重要的作用。

第三节 芽胞杆菌培养条件

一、概述

培养基（medium）是人工配制的，适合微生物生长繁殖或产生代谢产物的营养基质。无论是以微生物为材料的研究，还是利用微生物生产生物制品，都必须进行培养基的配制，它是微生物学研究和微生物发酵工业的基础。总体而言，所有微生物生长繁殖均需要培养基含有碳源、氮源、无机盐、生长因子、水及能源，但由于微生物营养类型复杂，不同微生物对营养物质的需求是不一样的，因此首先要根据不同微生物的营养需求配制针对性强的培养基。

控制 pH 条件。培养基的 pH 必须控制在一定的范围内，以满足不同类型微生物的生长繁殖或产生代谢产物。各类微生物生长繁殖或产生代谢产物的最适 pH 条件各不相同，一般来讲，细菌与放线菌适于在 pH7～7.5 时生长，酵母菌和霉菌通常在 pH4.5～6 时生长。值得注意的是，在微生物生长繁殖和代谢过程中，由于营养物质被分解利用和代谢产物的形成与积累，培养基 pH 发生变化，若不对培养基 pH 条件进行控制，往往导致微生物生长速度和代谢产物产量降低。因此，为了维持培养基 pH 的相对恒定，通常在培养基中加入 pH 缓冲剂。国内对 12 种芽胞杆菌发酵条件进行了研究，现综述如下。

（1）地衣芽胞杆菌（*Bacillus licheniformis*）

为了对产碱性蛋白酶的地衣芽胞杆菌 D-1 的培养条件进行优化，利用 10L 发酵罐，采用正交设计 $L_9(3^4)$ 试验，对培养温度、pH、搅拌转速、通气量 4 个条件进行优化，得到地衣芽胞杆菌 D-1 发酵产碱性蛋白酶的最优培养条件为：培养温度 37℃，pH7.5，通气量 4L/min，搅拌转速 300r/min。利用最优条件组合进行验证实验表明，该培养条件下地衣芽胞杆菌 D-1 碱性蛋白酶的酶活为 91.26U/ml（刘海进等，2011）。对地衣芽胞杆菌在细菌麸曲培养过程中的最佳培养基和最佳培养条件进行了研究。结果表明，地衣芽胞杆菌麸曲产中性蛋白酶的最佳培养基为玉米粉 8g/L、黄豆粉 2g/L、麸皮 10g/L；最佳培养条件为温度 40℃，pH7.0，接种量 10%，培养 60h 时，产中性蛋白酶活性达最大，为 192U/ml（袁超等，2011）。以牛肉膏蛋白胨培养基为初始培养基，探讨了不同培养时间、初始 pH、温度、盐度（NaCl 浓度）和转速对中华绒螯蟹源地衣芽胞杆菌 ESB3 生长的影响。结果表明：菌株 ESB3 产最大活菌数的培养条件为培养时间 20h，初始 pH 为 7.8，温度为 30℃左右，盐度为 1.5%（*m*/*V*），转速为 190r/min。采用单因素试验和正交试验优化了种子培养基的组成，结果表明，最佳种子培养基为可溶性淀粉（2%）（*m*/*V*）、胰蛋白胨（2%）（*m*/*V*）、K_2HPO_4（0.3%）（*m*/*V*），此条件下菌株 ESB3 活菌数达 11.09×10^8CFU/ml（郝向举等，2010）。

（2）短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）

短短芽胞杆菌 JK-2 对多种植物病原真菌和病原细菌具有明显的抑制作用。以菌株 JK-2 发酵液对番茄枯萎病菌的抑制作用为活性指标，对其培养基成分和培养条件进行了

优化。由正交试验和单因素试验得出的最佳培养基配方为淀粉 1.0%、牛肉浸膏 0.5%、蛋白胨 0.3%、蔗糖 1.0%、酵母 1.5%和 $CaCl_2$ 0.5%，初始 pH7.0。在 30℃、170r/min 振荡培养条件下，最佳发酵时间为 48h，装液量 100ml/瓶，接种量 1%（郝晓娟等，2009）。

（3）短小芽胞杆菌（*Bacillus pumilus*）

采用单因素试验和正交试验的方法研究了短小芽胞杆菌固态发酵生产木聚糖酶的培养条件，确定了利用麸皮作为主要基质进行固态发酵生产木聚糖酶的适宜条件：pH9、温度 35℃、料液比 1∶2、接种量 10%。在 500ml 三角瓶中固态培养 72h 左右，木聚糖酶的活力可达 4915U/g 干曲（程显好等，2009）。利用一株具有转化油酸进行羟基化的短小芽胞杆菌突变株 M-F641 发酵生产具有重要功能的 ω-羟基脂肪酸。以细胞生长、NADPH 生成及油酸转化产物为测定指标，研究了培养基的最佳碳源及其发酵工艺条件；在单因素试验的基础上，采用响应面法，以油酸转化率作为指标，优化了发酵工艺条件，并对优化后的发酵条件进行了验证。最佳碳源为葡萄糖，其最佳初始质量浓度为 20g/L，最佳发酵条件为：温度 30℃、pH7.4、装液量 60ml/250ml。在此条件下油酸转化率为 74.58%，ω-羟基脂肪酸产率达 22.3%。在优化的发酵条件下羟基脂肪酸生产效率得到了显著提高（吴立新和吴祖芳，2011）。

（4）多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）

对一株从土壤中筛选的产絮凝剂微生物 GA1 进行了研究。该菌株经形态学特征、生理生化反应及 16S rDNA 序列（GenBank 序列登录号为 DQ166375）相似性分析鉴定为多粘类芽胞杆菌，并命名为 *P. polymyxa* GA1。对其进行了产絮凝剂培养条件和培养工艺的研究，结果表明：菌株 GA1 产絮凝剂的最佳培养基成分为蔗糖 40.0g/L、酵母浸膏 4.0g/L、K_2HPO_4 5.0g/L、KH_2PO_4 2.0g/L、NaCl 0.1g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.2g/L。研究了该菌株产絮凝剂的最佳培养条件，包括培养基的初始 pH、培养温度、摇床速度和接种量。同时针对其产絮凝剂和菌体生长的关系，首次将分段培养工艺应用于 GA1 产絮凝剂中，即在培养的初期 24h 内采用菌体生长最佳培养条件，在培养后期采用菌体产絮凝剂的最佳培养条件。结果表明，采用分段培养的工艺，既可保证 GA1 絮凝剂的产量，又能缩短培养周期（杨朝晖等，2006）。10 倍稀释法筛选出最佳产抑菌活性物质的多粘类芽胞杆菌 Dw-6，试验表明菌株 Dw-6 最佳培养基为发酵培养基。利用四因素均匀设计方案进行培养基配方的优选，同时进行培养时间和发酵条件的优化。结果表明，菌株 Dw-6 优化后的培养基配方为（50ml）蛋白胨 3.83g、酵母浸出粉 3.9g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.105g、$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.17g，最佳培养时间 48h，初始 pH7.0，培养温度 30℃。经培养基优化后，菌株 Dw-6 在培养基初始 pH7.0 时，30℃培养 48h 的发酵上清液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及出芽短梗霉菌均表现出很强的抑制作用（文凤云等，2011）。

（5）韩研所类芽胞杆菌（*P. kribbensis*）

通过单因素及正交试验，对一株胶冻样芽胞杆菌的培养基组成（碳、氮、生长因子、无机盐）及工艺条件（温度、起始 pH、装液量）进行了研究。结果表明，比较理想的配方是：糖蜜 2%、豆粕 0.5%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.1%、$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.05%、$CaCO_3$ 0.1%；起始 pH7.5，培养温度 36℃，装液量 30ml/250ml 锥形瓶。在此基础上利用 70L 发酵罐进行发酵，培养周期 33h，芽胞量可以达 $9.58×10^8$CFU/ml，高于国家规定的液体菌肥

5×10^8CFU/ml 的标准，解决了原配方不产芽胞的难题，培养周期缩短了一半（吴向华和刘武星，2006）。赵艳等（2009）于 2007 年 9 月从草地早熟禾（*Poa pratensis*）根际土壤中筛选得出 3 株胶质芽胞杆菌（*B. mucilaginosus*）为试验材料，对其培养条件及典型生长曲线开展研究。结果表明，菌株在 10～45℃均可生长，最适生长温度在 35～40℃；最适生长初始 pH 为 7.5～8.0；菌株 K7、K3、K5 的最佳通气量分别为 220ml、100ml 和 150ml；并在上述基础上经过进一步试验得到了菌株的典型生长曲线。试验数据对于了解与掌握菌株的生长规律及作为生物菌肥加以利用具有重要的意义。

（6）巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）

为了获得高密度培养的解磷细菌菌剂，以一株解磷巨大芽胞杆菌为研究对象，以 OD_{600} 为依据测定活菌数量，优化最佳液体发酵培养条件。首先采用单因素试验对其培养条件如接种量、装液量、发酵温度、起始 pH、发酵时间、摇床转速等进行筛选，获得单因素试验最佳值；并制作菌株生长曲线。研究结果表明：该株巨大芽胞杆菌的最佳培养条件为：发酵温度 30℃、起始 pH8.0、装液量 20ml/250ml 三角瓶、接种量 3%、摇床转速 250r/min、培养时间 22h。在此最优条件下培养，以平板涂布法计数，发酵液最终活菌数达 3.2×10^9CFU/ml 以上。培养 2～8h，菌体生长处于对数期，8h 后菌体生长进入稳定期，22h 后进入衰亡期。试验结果为工业生产解磷巨大芽胞杆菌菌剂提供了基础数据（王金玲等，2013）。采用单因素试验，分别考察培养时间、碳源、氮源、碳氮浓度比、pH、金属离子、培养温度和接种量对巨大芽胞杆菌 MBFF6 产絮凝剂的影响，同时对絮凝剂的热稳定性和化学性质进行研究。结果表明：巨大芽胞杆菌 MBFF6 产絮凝剂的最佳培养基组成为葡萄糖 5g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 0.5g/L，K_2HPO_4 5g/L，KH_2PO_4 2g/L，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.2g/L，初始 pH7；最佳培养条件为 2%接种量，温度 30℃，转速 150r/min，时间 24h；该絮凝剂具有良好的热稳定性；经化学反应分析，定性判断出该絮凝剂的有效成分是多糖和蛋白质；经红外光谱分析，该絮凝剂分子结构中有羟基、氨基、羰基和甲氧基，表明该絮凝剂产生菌 MBFF6 具有营养要求简单、发酵周期短和絮凝活性高的优点，是一株很有应用前景的絮凝剂产生菌（曹芳等，2012）。对基因工程菌 pHBM-End 培养条件优化的研究结果表明：250ml 三角瓶中装入 50ml LB 培养基（含有 10μg/ml 四环素）。按 5%的接种量接种种龄为 12h 的液体种子，培养 4h 后加入终浓度为 0.2%的木糖进行诱导，9h 后上清液中酶活可达 889U/ml，是初发菌株 C-36（79.2U/ml）的 11.22 倍（韩学易等，2008）。探明巨大芽胞杆菌生防菌株 RB10 的发酵培养条件，提高其抑菌活性。首先采用麸皮和豆粕作为供试菌的碳氮源，通过单因素（C 源、N 源）优化实验得出豆粕 1.0%、麸皮 1.5%的条件下具有较好抑菌效果。采用 Plackett-Burman 设计筛选出主要影响因素为麸皮、豆粕和 pH。菌株 RB10 的最佳发酵培养基配方为麸皮 0.98%、豆粕 1.14%、初始 pH7.39，最佳发酵条件为接种量 1.5%、温度 39℃、发酵时间 78h、转速 190r/min。在此发酵条件下，拮抗细菌 RB10 的抑菌率为 69.416%，与理论值 69.974%相差 0.797%（理论误差<1%），试验值与预测值基本相符。响应面法优化出的 RB10 的发酵培养条件参数准确可靠，证实了模型的有效性（印杨等，2013）。

（7）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

以酵母粉蛋白胨培养基为基础培养基，探讨了不同培养时间、接种量、初始 pH、碳

源、氮源、金属离子对枯草芽胞杆菌 BGJ222 表达 β-半乳糖苷酶能力的影响。结果表明，菌株 BGJ222 最大产酶量的培养条件为：初始 pH6.6，接种量 2%（*V*/*V*），培养温度 37℃，培养时间 24h。培养基组成为：酵母粉 0.5%（*m*/*V*），蛋白胨 1.0%（*m*/*V*），NaCl 0.5%（*m*/*V*），三梨醇 1.0%（*m*/*V*），$MgCl_2$ 0.5%（*m*/*V*）。在此条件下，菌株 BGJ222 表达 β-半乳糖苷酶达 11 456.4 Miller，比基础培养基的表达量（860 Miller）提高了 12 倍（祁艳霞等，2012）。从近海土壤中分离到一株产纤维素酶的菌株，经形态和生理生化指标鉴定为枯草芽胞杆菌。对产酶菌株的碳源、氮源、金属元素、培养温度、pH 和接种量进行优化，确定最佳培养组分和条件为：20g/L 葡萄糖、10g/L 胰蛋白胨、3g/L K_2HPO_4、3g/L NaH_2PO_4、2g/L 氯化铁，pH6.5，培养温度 32℃。优化后纤维素酶系中以羧甲基纤维素酶活性最高，为 72.37U/ml，其次是 β-糖苷酶和微晶纤维素酶（程仕伟等，2013）。利用热带假丝酵母菌和枯草芽胞杆菌混菌发酵进行液体制种。结果表明：受接种量、豆粕含量和培养温度的影响，两株菌种菌数的增长速度具有相对一致的变化趋势；受培养时间的影响，热带假丝酵母菌先增后降，枯草芽胞杆菌先降后增；热带假丝酵母菌在 pH3.5 时菌数最大，枯草芽胞杆菌在 pH4.5～7.5 时适宜生长。在豆粕质量分数 15%、葡萄糖质量分数 1%、初始 pH4.5 的液体培养基上，两菌分别接种 10%，在发酵温度 28℃、摇床转速 160r/min 条件下培养 5d，热带假丝酵母菌和枯草芽胞杆菌菌数达最大，分别为 752.5×10^6CFU/ml 和 264.2×10^7CFU/ml（王颖等，2012）。纳豆枯草芽胞杆菌作为犊牛直接饲用微生物，对增强犊牛机体免疫和促进胃肠发育有益，然而以豆类物质为发酵底物的微生物制剂不适用于犊牛。本研究采用纳豆枯草芽胞杆菌液体培养方法，对培养条件的氮源、碳源、接菌量、装液量、转速和温度进行正交试验，结果表明，在葡萄糖 1%、蔗糖 1%、大豆蛋白胨 6%、胰蛋白胨 4%、接种量 2%、装液量 5ml/dl、180r/min、37℃的培养条件下，发酵 24h 时，660nm 吸光度值达 1.1475。而后进行不同装液量试验，结果表明 1000ml 容器装液量为 400ml 时，菌体细胞数量达最高（4.6×10^{10} 个/ml）（邓露芳等，2008）。应用统计学方法优化了 *B.sustilis* CNMC-0014 产中性蛋白酶的培养基组分。单因素试验研究发现，在测试的 6 种碳源中，以甘油和玉米粉对产酶影响显著，酶活性分别达到（3955.16±2.15）U/ml 和（3939.15±1.87）U/ml。氮源试验中发现，大豆粉对产酶影响最为显著，酶活性达（4318.12±5.66）U/ml。通过极差分析与正交分析优化了培养基配比，优化方案为 2%玉米粉、1%甘油、3%玉米粉和 3%麸皮。方差分析结果发现，甘油和玉米粉对产酶影响显著（$P<0.05$），大豆粉对产酶影响极显著（$P<0.01$），麸皮对产酶影响不显著（$P>0.05$）。同时，还研究了金属离子、溶氧、起始 pH、菌龄及接种量对产酶的影响，研究结果表明，Ca^{2+}、Na^+、Zn^+、Mn^{2+}可以在不同程度对产酶有激活作用，特别是 Ca^{2+}，酶活性达到 4552.97U/ml，而 Fe^{3+}、Fe^{2+}、K^+、Ag^+对产酶有强烈的抑制作用，特别是 Ag^+（酶活性仅为 987.46U/ml），最适摇瓶装量为 50ml/300ml，最佳起始 pH 为 7.5，最佳菌龄与接种量分别为 24h 和 3%（肖怀秋等，2008）。对发酵产抗白念珠菌物质的培养基及培养条件进行优化，使抗菌物质的产量得到提高。方法以基本培养基为基础，利用单因素试验，确定碳氮源。采用 Plackett-Burman 设计对培养条件中相关影响因素的效应进行评价并筛选出重要的影响因素。然后用 Box-Behnken 设计及响应面法确定了重要影响因素的最佳条件。优化后的碳源为蔗糖 4%，氮源为硫酸铵

0.5%，发酵条件为 pH7.53，温度 30.48℃，培养时间 64.4h。优化后的抗菌抑菌圈直径达 40.00mm，比优化前的 18.25mm 提高了 119.2%（王德培等，2012）。采用单因素、双因子及正交试验，对枯草芽胞杆菌 B2 的培养液组成（碳源、氮源、酵母膏、pH）及培养条件（装液量与转速）进行了研究，结果表明：以葡萄糖 1%，牛肉膏 0.8%，酵母膏 0.5%及 pH8 制成的培养液，装液量 100ml/250ml 锥形瓶，转速 140r/min，培养菌株 B2 36h 为最佳培养条件，在此条件下，活菌数可达 2.97×10^{10}CFU/ml，分别是 D 培养液和 NB 培养液的 2.05 倍和 52.36 倍（闫沛迎等，2008）。培养液的初始 pH 直接影响菌株 B-903 的生长繁殖，从而对其抗菌物质的产生和积累产生重要影响。pH 小于 5 时，不利于细菌生产繁殖。pH6～8 时有利于细菌的增殖，抗菌活性也最强。培养过程中供氧下菌体繁殖和抑菌活性呈正相关，而培养液初始接菌量高时可缩短抗菌物质出现的时间。基本物质的初步筛选试验证明： 大米粉、豆饼粉、麦麸、酵母粉、$CaCO_3$ 及 KH_2PO_4 是发酵中最佳的营养物质（孔建和王文夕，2000）。以牛肉膏蛋白胨培养基为初始培养基，探讨了不同培养时间、初始 pH、温度、接种量、碳源、氮源、无机盐对枯草芽胞杆菌 BHI344 生长的影响。采用正交试验法优化了培养基的组成。结果表明：菌株 BHI344 产最大活菌数的培养条件为初始 pH7.6、接种量 5%（*V*/*V*）、培养温度 35℃、牛肉膏 2.0%（*w*/*V*）、葡萄糖 1.5%（*w*/*V*）、氯化钙 0.3%（*w*/*V*）；以此条件培养，菌株 BHI344 的活菌数达 2.62×10^{9}CFU/ml（罗璋等，2007）。测定了枯草芽胞杆菌 BSPE2501 菌体和在不同培养时间、培养基、培养基量、转速条件下获得的发酵液对草坪炭疽菌的抑制作用。结果表明：菌株 BSPE2501 菌体和发酵液对病原菌菌丝生长和孢子萌发均有明显抑制作用；在 NB 和 BPY 培养基中培养获得的发酵液的抑制作用高于在 LB 和 PD 培养基中的抑制作用，其一倍发酵液对菌丝生长的抑制率分别达 66.2%和 65.5%，明显高于 LB 培养基（53.5%）、PD 培养基（45.8%）的抑制率；其孢子萌发抑制率分别为 44.6%、43.1%，高于 LB 培养基（35.2%）、PD 培养基（28.6%）的抑制率；在 NB 培养基中培养 72h、培养基量为 100ml、培养转速为 150r/min 条件下获得的发酵液的抑菌效果最好，发酵液对菌丝生长和孢子萌发的抑制率分别为 85.3%和 46.9%、75.7%和 43.1%、67.2%和 43.4%（刘宝军等，2008）。以枯草芽胞杆菌 H4 为试验材料，利用 Plackett-Burman 设计，对影响菌体生长的 7 个因素进行了筛选，确定影响该菌生长的主要因素为牛肉膏、转速、蛋白胨和 NaCl；采用响应面法对其中 3 个重要因子的最佳水平进行研究。结果表明，当牛肉膏为 8.635g/L，蛋白胨为 13.737g/L，NaCl 为 5.345g/L，接种量 6.25%，初始 pH7，温度 39℃，转速 150r/min 培养时，菌体密度显著提高，菌株 H4 的 OD_{440} 值由 0.899 提高到了 1.129（李亚玲等，2009）。通过进行正交试验，结果表明枯草芽胞杆菌生防菌 TH2 高产抗菌物质培养基的最佳配方为豆饼粉 1.5%、玉米粉 0.5%、麦麸 0.5%、大米粉 0.5%，最佳的培养条件为通气量 25ml/250ml 装瓶量、pH 为 7.5、温度为（28±1）℃，这样产生的抗菌物质最多。枯草芽胞生防菌株 TH2 培养过程中，pH 从培养初始的 7.0，经下降又逐步上升到 48h 的 7.8；OD_{650} 从培养初始的 0.56，逐步上升到 36h 的 1.10，而后逐渐下降，84h 降到 0.85；孢子生成从 12h 开始，孢子数达 58.2×10^{8}CFU/ml，而后逐渐增加，48h 达高峰，孢子数达 58.2×10^{8}CFU/ml，随后孢子数逐渐下降，抑菌圈直径随着发酵时间增加逐渐增大（林国宪等，2003）。为在最大程度上提高有机磷降解菌——枯

草芽胞杆菌 XK-1 的芽胞产量，对其产芽胞的条件进行系统研究。以菌体芽胞化的方式增强该菌适应性，采用单因素和正交试验的方法，考察不同的氮源、碳源、无机盐、pH、温度、培养时间、接种量对枯草芽胞杆菌形成芽胞的影响。结果表明：菌株 XK-1 产芽胞的最佳培养基组成为 3%大豆蛋白胨、0.1% $CaCl_2$ 和 0.05% NaCl，在此基础上的最佳培养条件为 pH7.5，温度为 40℃，发酵时间为 48h，接种量为 2%。经优化后，该菌株的产芽胞率达 96%，为下一步该菌株在复合生物肥中的应用打下基础（甄静等，2012）。为了提高枯草芽胞杆菌的芽胞数量及产芽胞率，采用分批培养法研究了营养条件、初始 pH、溶氧量对其生孢的影响。结果表明，麸皮和玉米粉分别是枯草芽胞杆菌生孢的最佳碳源和氮源；无机盐和锰元素对芽胞生成有显著的影响。最佳生孢培养基组成：麸皮 5g，玉米粉 10g，NaCl 5g，KH_2PO_4 1g，$MnSO_4.H_2O$ 0.4g，水 1000ml。最佳产胞条件：初始 pH 为 7.0，最佳装液量为 250ml 锥形瓶装 50ml 培养液。在 150r/min、30℃恒温培养 72h 后，芽胞数可达 3.4×10^9CFU/ml，产芽胞率可达 82.9%（郭夏丽等，2012）。研究了枯草芽胞杆菌 LB-B3 的培养条件及其在净化对虾养殖池水样方面的效果。实验分别设置了 9 个不同的 pH 梯度（pH2～10）和 6 个不同接种量梯度（0.3%、0.5%、1%、3%、5%和 7%），以光密度（OD 值）为生长指标，进行了枯草芽胞杆菌培养条件的优化实验；同时又设置了 5.2×10^4CFU/ml、1.04×10^5CFU/ml、1.56×10^5CFU/ml 和 2.08×10^5CFU/ml 接种待处理水样，测定了 96h 内化学耗氧量、亚硝酸氮、氨态氮和溶氧等 4 个水质指标的变化情况。结果表明：pH7.0、接种量为 7.0%时，OD 值最大；枯草芽胞杆菌能显著净化水质，但使用后会暂时性增加耗氧（汤保贵等，2007）。从茅台酒生产环境中分离纯化得到一株枯草芽胞杆菌，对该菌株培养基的小麦粉浓度、初始 pH、培养温度 3 个因素进行正交试验，确定其最适培养条件，并分析在该培养条件下所产代谢物。试验确定的最适培养条件为：小麦粉 1.5%，初始 pH7.0，培养温度 35℃，培养时间 12h，蛋白胨 1%，酵母膏 0.5%，氯化钠 1%，磷酸氢二钾 0.5%。利用气质联用色谱仪分析其代谢产物，检测到 30 多种物质，主要为酸、酯类物质（姚翠萍等，2010）。对枯草芽胞杆菌液体培养条件进行了优化，通过单因素试验及正交试验，优化出液体培养条件为：枯草芽胞杆菌最适生长温度为 32℃，pH 为 7.2，转速为 140r/min，接种量为 9%；芽胞生长最适温度 36℃，最适 pH 为 7.2，最适转速 120r/min，最适接种量为 9%；温度对枯草芽胞杆菌的生长量及芽胞率影响最大（吴青录和秦秀丽，2012）。枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*) JA 能够对多种植物病原菌如小麦赤霉菌、西瓜枯萎病菌、黄瓜黑星病原菌、油菜菌核病原菌、小麦白粉病原菌等有良好的抑制效果，利用离子注入诱变筛选高效植物病原真菌拮抗菌并且对菌株 JA 的发酵特性做了进一步的研究，获得了两株高效拮抗菌。其发酵水平的抑菌圈直径从 16.62mm 提高到 21.23mm，经传代实验表明，其遗传性较为稳定（叶枝青和姚建铭，2001）。将枯草芽胞杆菌在不同培养条件下培养微生物絮凝剂，通过絮凝剂对煤泥水的沉降絮凝试验，创建数学模型，优化生产絮凝剂的培养条件；对煤泥和提取的微生物絮凝剂分别进行 X 射线衍射和红外光谱检测，分析煤泥矿物特性和絮凝剂絮凝有效组分（侯志翔和张东晨，2012）。为了提高枯草芽胞杆菌 B68 芽胞形成率及芽胞数量，研究了营养条件、初始 pH、溶氧水平对其芽胞产量的影响。结果表明：芽胞形成的最适培养基组成为：葡萄糖 10g/L、大豆饼粉 10g/L、NaCl 5g/L、$MnSO_4\cdot H_2O$ 0.6g/L；最

佳初始pH7.0，最佳装瓶量为250ml三角瓶装100ml培养液。在此条件培养下，于150r/min、28℃恒温培养 72h 后，芽胞数量最高可达 1.60×10^{14}CFU/ml，芽胞形成率可达 88.92%（宋卡魏等，2007）。以在油菜根际高效定殖的枯草芽胞杆菌 TU100 为材料，研究其主要抗菌物质的代谢条件。证明其主要拮抗物质属胞外分泌型，释放到培养液中。对油菜菌核病菌具有较高的抑制活性。菌株 TU100 在 28～30℃生长旺盛，产抗菌物质也较多；培养 48h 数量达最大值。培养 72h 抗菌物质的产生量达高峰。培养液的初始 pH6～8 有利于菌株 TU100 增殖，抗菌物质活性也最强；通气良好的条件下菌株 TU100 生长好、产抗菌物质量多；培养基 C/N 为 15 时有利于菌株 TU100 生长及抗菌物质的积累（赵瑞等，2007）。枯草芽胞杆菌 CAB-1 是一株对番茄灰霉病有显著防效的生防菌株，抑菌蛋白是其产生的主要抑菌物质之一。研究表明，菌株 CAB-1 产生抑菌蛋白的最佳培养条件为：接种量 2%，培养温度 30℃，转速 180r/min，装液量 100ml/250ml，培养时间 48h。考马斯亮蓝法测得最佳培养条件下菌株 CAB-1 产生的粗蛋白质浓度为 0.16mg/ml。该粗蛋白质对胰蛋白酶及蛋白酶 K 不敏感，胃蛋白酶处理使其活性降低 14%；抑菌蛋白在 100℃以下处理 30min 活性变化差异不显著，而 121℃处理 30min 其抑菌活性为对照的 72%。抑菌蛋白对酸碱的耐受范围广，在 pH3～12 时抑菌活性均能保持在 75%以上，pH 为 2 时抑菌活性降低为对照的 59%。经甲醇、氯仿、乙醚、乙酸乙酯及丙酮处理后该粗蛋白质的抑菌活性变化不大（张晓云等，2011）。对枯草芽胞杆菌发酵产碱性蛋白酶的生产进行工业放大和培养条件的优化。采用此优化培养基对发酵菌株的培养条件进行单因素试验。结果表明最佳的发酵培养基培养条件是：pH 为 9.0 左右、最佳发酵时间为 36h 左右，最佳发酵温度为 30℃。此外，还简单介绍了利用该工艺制备其他几种碱性蛋白酶，如食品专用酶、科研专用酶、洗涤专用酶等（路晓飞等，2012）。研究杨木 APMP 废液培养枯草芽胞杆菌 SY1 的适宜条件和转化液对番茄病原菌的拮抗作用。通过单因素试验对培养条件进行了初步优化；利用平板扩散法测定转化液对番茄病原菌的抑制作用。杨木 APMP 废液培养菌株 SY1 较适宜的条件为：pH8.0，装液量 75ml /250ml，接种量 5%，温度 35℃；在此培养条件下菌株 SY1 的活芽胞数达 3.96×10^{8}CFU/ml，废液 COD 转化率达 59.52%。同时发酵液对供试的 4 种病原菌均有较强的抑菌作用。该研究为利用杨木 APMP 废液培养枯草芽胞杆菌的工业深层发酵提供了依据（杨文艳等，2008）。枯草芽胞杆菌 S368 是以鸟苷生产菌株 A066 为出发菌经诱变所得。对该菌株进行培养条件研究的过程中，发现该菌株可以在摇瓶纯培养条件下积累鸟苷，实验结果表明，发酵过程中，腺嘌呤的用量为 0.35mg/ml 时，发酵液中鸟苷积累量最大，培养基中腺嘌呤的用量高于或低于 0.35mg/ml 均不利于鸟苷产物的积累，培养基中味精、硫酸铵、硫酸镁、磷酸二氢钾及 Mn^{2+}用量显著影响发酵液中鸟苷积累水平，培养基中生物素、蛋氨酸、精氨酸、组氨酸、氯化钙及 Fe^{2+}、Zn^{2+}用量与鸟苷积累的相关性不显著（刘咏梅等，2001）。家畜饲料工业中生产的商品酶制剂的微生物源基本相似，但由于所选择的微生物种属、底物及培养条件不同，酶的种类和所产生的活性有很大的差异。商品酶产品相对来说是经浓缩和纯化的，含有特定的酶，并有一定的活性，通常不含活细胞。反刍动物日粮中的酶产品来自真菌（主要是长柄木霉、黑曲霉和米曲霉）和细菌（主要是枯草芽胞杆菌）（刘芳和潘晓亮，2007）。

（8）蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）

为研究培养条件对蜡状芽胞杆菌B-02生长和对番茄灰霉病菌（*Botrytis cinerea*）抑菌活性的影响，分别采用分光光度法、琼脂孔扩散法和杯碟法进行菌株B-02的菌体量和抑菌活性的测定。结果表明，菌株B-02的最佳培养条件为：装液量50ml（250ml三角瓶），接种量1%（*V*/*V*），转速140r/min，温度32℃，初始pH为9.0的NB培养基中培养36 h；在此条件下菌株B-02抑菌活性比初始条件提高16.22%（刘婧等，2008）。通过单因素试验和正交试验，以蜡状芽胞杆菌深圳菌株754-1产磷酯酶C（PLC）在卵黄平板上形成的乳白色晕圈的直径大小作为考察指标，对影响菌株754-1产PLC的各因素进行了初步研究。结果表明，菌株754-1产PLC的最佳培养条件为：蛋白胨1.0%、牛肉膏0.3%、酵母膏0.2%、NaCl 0.5%、Zn^{2+} 0.1mmol/L、卵黄5.0%、接种量0.5%，发酵温度32℃，培养时间12h（高林等，2007）。从沈阳张士灌区镉污染土壤中筛选出一株对镉吸附性强的耐镉细菌SY，经形态学观察、生理生化测定和16S rDNA序列分析，确定SY为蜡状芽胞杆菌。在Cd^{2+}初始浓度为20mg/L条件下，通过改变培养温度、培养时间、pH、渗透压（NaCl的含量）等条件研究细菌SY吸附镉的最优生长条件。结果表明，最优条件为培养温度40℃，培养时间27h，pH7，NaCl含量0.5%（李辉等，2010）。利用制酒废水替代成本较高的传统培养基进行细菌型絮凝剂产生菌的培养，并对5株絮凝剂产生菌的培养条件进行了考察。结果表明：无机氮源可以作为细菌生长和絮凝剂合成的外加氮源，促进细菌的生长和絮凝剂的合成，5株细菌都在C/N为15∶1～25∶1时有较好的絮凝活性（张帆等，2010）。

（9）凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）

对经N^+注入筛选到的L-乳酸高产菌株*B. coagulans* RS12-6的发酵条件进行了初步研究。主要研究了通气量、温度及pH等培养条件对菌体生长及产酸的影响。确定最佳培养条件及最佳碳源、氮源配比（周剑和虞龙，2005）。通过单因素及正交试验对凝结芽胞杆菌T50的产芽胞条件进行了优化，最终确定了摇瓶最佳培养条件：培养基组成（质量分数）为蛋白胨2%，葡萄糖0.2%，酵母浸粉0.3%，麸皮5%；培养基初始pH7.0，接种量2%，培养时间3d。最终使芽胞形成率达94.3%（路程等，2009）。通过单因素试验和正交试验，对凝结芽胞杆菌NJ-2的产芽胞发酵条件进行了优化。优化后的培养基组成为：玉米面30g/L、豆粕27g/L、$(NH_4)_2SO_4$ 13g/L、麸皮30g/L、$MgSO_4$ 1g/L、Na_2HPO_4 10g/L、NaH_2PO_4 0.5g/L，pH7.0。最优的培养条件为：温度40℃，初始pH7.0，转速180r/min，装液量100ml（500ml的三角瓶），接种量6%（*V*/*V*），发酵时间36h。在该优化条件下，芽胞形成率达85%（于佳民等，2013）。在摇瓶1L、5L自动发酵罐中考察了碳源、氮源、无机盐、微量元素、Mn^{2+}、pH、温度、接种量、溶氧水平对凝结芽胞杆菌液体培养形成芽胞的影响。芽胞形成的最适培养基组成为：麸皮20g/L、酵母膏5g/L、豆粕10g/L、NaCl 5g/L、K_2HPO_4 3g/L、$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.3g/L。最适培养条件为：初始pH7.0，接种后最适起始芽胞浓度为10^6CFU/ml，培养温度为40℃，180r/min摇瓶培养，250ml三角瓶中最适装液体积为15ml。在15L自动发酵罐中扩大培养，控制溶氧在30%以上，培养20h，芽胞数量可达5.8×10^9CFU/ml，芽胞率达96.7%。试验获得的最佳培养条件可进一步应用于生产（陈秋红等，2009）。通过培养基组成正交试验及培养条件单因素试验，

对一株凝结芽胞杆菌的产芽胞条件进行了优化，优化后的培养基组成（质量分数）为酵母粉 3g/L、蛋白胨 5g/L、牛肉膏 2g/L、$MnSO_4$ 0.005g/L、NaCl 2g/L、K_2HPO_4 3g/L、$MgSO_4$ 0.02g/L。最优的培养条件为温度 40℃，初始 pH 为 7.0，转速 210r/min，装液量为 250ml 的三角瓶装 30ml，接种量为 6%（*V*/*V*），发酵时间为 48h。最终的芽胞数为 9.1×10^8CFU/ml（杨立华等，2010）。

（10）嗜热芽胞杆菌（*B. thermophilus*）

研究培养条件对嗜热芽胞杆菌 HU1 产酶的影响，为工业化发酵生产酶及壳寡糖的制备提供依据。采用摇瓶培养方式，对嗜热芽胞杆菌 HU1 产几丁质降解酶及脱乙酰基酶的培养条件进行研究。最佳诱导碳源为粉末几丁质，其最适添加量为 3.5%；最佳氮源为酵母粉，最适添加量为 1.0%；初始 pH 为 6.0 时，有利于产酶；Cu^{2+}对酶的合成表现出明显的抑制作用；而 Ca^{2+}则能有效增加产酶能力。Mg^{2+}及 Zn^{2+}对嗜热芽胞杆菌 HU1 两种酶的合成无显著影响；培养 72h，产酶量达最高。以粉末几丁质为底物，对粗酶液的水解产物进行了分析，其 12h 的水解产物主要集中于分子质量为六糖以下的壳聚糖。利用粗酶液制备小分子壳寡糖工艺流程简单，为后期进一步开发保健品、生物农药、饲料添加剂、食品添加剂等奠定了基础（戴德慧等，2011）。

（11）嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌（*G. stearothermophilus*）

研究嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌 CHB1 的生长特性与培养条件。以菌体生长量为主要评价指标，利用单因素试验与正交试验相结合的方法对影响菌株 CHB1 生长的主要因素进行分析。菌株 CHB1 最低和最高生长温度分别为 45℃和 74℃，最佳培养温度为 60℃；最低和最高起始生长 pH 分别为 6.5 和 9.0，最适起始 pH 为 8.0；菌体生长到达对数期的时间为 15～18h；接种量 2%，装液量 40ml，转速 180r/min。菌株 CHB1 为高温菌，生长 pH 范围偏碱性，条件优化后总菌体浓度可达 1.1×10^9CFU/ml（任香芸等，2007）。

（12）苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）

采用摇瓶发酵试验探讨了以蓝藻为原料制备苏云金芽胞杆菌生物杀虫剂的可行性，并考察了不同培养条件（蓝藻含固率、种龄、接种量、初始 pH、摇床转速、发酵温度）对苏云金芽胞杆菌生长增殖、产孢与产毒效果的影响。研究结果表明，无需任何预处理工序，菌株 k130 能在以蓝藻为唯一原料的培养基中正常生长发育，并且产孢产毒。发酵 48h 后，芽胞产率达 86.7%，远高于常规培养基；生物毒效为 282IU/ml，与常规培养基相当。培养条件优化结果表明，在蓝藻含固率为 2%、初始 pH 为 7.0、接种物种龄为 9h、接种量为 2%、培养温度为 30℃、摇瓶转速为 200r/min 的条件下培养 48h，菌株 k130 可达较好的发酵效果，活菌数及抗热芽胞数可达 7.32CFU/ml 和 6.38CFU/ml，生物毒效为 528IU/ml。研究不仅为蓝藻提供了高附加值的处置新途径，而且可显著降低生物杀虫剂的生产成本，具有广阔的应用前景（蔡健等，2011）。在苏云金芽胞杆菌常用培养基的基础上，设计了 3 种改进苏云金芽胞杆菌产生伴胞晶体的培养基，从中筛选出一种比 1/2 LB、G-T 培养基培养周期短的 ZM 培养基。同时，改进了晶体蛋白的提纯方法——碱裂解法。改进后的方法与不连续蔗糖密度梯度离心法相比，简便易行，提取量大，在 Bt 的生化和生物活性研究上具有一定参考价值（左雅慧和丁之铨，1999）。化学杀虫剂的

长期使用给生态环境造成了严重破坏，也使害虫种群的抗药性日益提高，生物杀虫剂以其“绿色环保”的特点引起人们的广泛关注。其中，苏云金芽胞杆菌制剂是目前世界上产量最大、应用最广的生物杀虫剂。它对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、螨类等许多有害昆虫有毒杀作用，而对人类、动物和农作物无害。长期以来，人们一直致力于苏云金芽胞杆菌发酵过程的研究，以期获得高毒效的生物杀虫剂产品。首先对苏云金芽胞杆菌发酵生产的各种影响因素进行了综合分析，将影响因素分为培养条件和培养基组分两类，得出最佳培养条件为温度（30±1）℃，pH 为 7.0±0.1，搅拌速度为 400～600r/min，通气量为 1∶（0.6～1.2）（发酵培养基体积与每分钟通入空气的体积之比），无机盐含量 KH_2PO_4 或 K_2HPO_4 为 0.075%～0.2%，$MgSO_4·7H_2O$ 为 0.075%～0.3%，$CaCO_3$ 为 0.075%～0.15%，$MnSO_4·H_2O$、$FeSO_4·7H_2O$ 各为 0.002%。其次，对当前研究与工业化生产中的各种发酵工艺进行了评述，总结了现有发酵工艺的优缺点。在现有研究基础上，降低培养基原料成本、改进发酵工艺和采用基因学手段构建高效工程菌株将成为未来研究热点（常明等，2010）。以玉米淀粉生产过程中的浸泡液为培养基，摇瓶发酵培养苏云金芽胞杆菌生物杀虫剂，通过一系列单因素试验，考察了不同培养条件（种子液的种龄、接种量、浸泡液的含固率、初始 pH、摇床转速、发酵温度及发酵时间）对苏云金芽胞杆菌在玉米浸泡液中的生长（菌数增长与芽胞形成），在最佳摇瓶培养条件（种子液种龄 10h、接种量 2%、浸泡液含固量 3%、初始 pH7.0～7.5、摇床转速 200r/min、发酵温度 30℃）下发酵 48h，活菌数和活芽胞数分别可达 $7.9×10^8$CFU/ml 和 $5.5×10^8$CFU/ml，毒力效价为 698.0IU/μl。试验可为生物农药的工业化生产提供实用参数（卢娜等，2007）。

二、通气量对芽胞杆菌生长的影响

1. 概述

通气量是指在微生物培养过程提供氧气的量。根据氧与微生物生长的关系可将微生物分为好氧、微好氧、耐氧型、兼性厌氧和专性厌氧 5 种类型。因此，在培养不同类型的微生物时，一定要采取相应的措施保证不同类型的微生物能正常生长。例如，培养好氧微生物可以通过振荡或通气等方式使之有充足的氧气供它们生长；培养专性厌氧微生物则要排除环境中的氧，同时通过在培养基中添加还原剂的方式降低培养基的氧化还原电势；培养兼性厌氧或氧的耐氧型微生物，可以用深层静止培养的方式等。微生物与氧的关系：好氧微生物类型最适生长的氧体积分数等于或大于 20%；微好氧最适生长的氧体积分数为 2%～10%；耐氧型最适生长的氧体积分数为 2%以下；兼性厌氧最适生长的氧体积分数有氧或无氧，专性厌氧不需要氧、有氧时死亡。

氧对于好氧微生物生长虽然可以通过好氧呼吸产生更多的能量，满足机体的生长需要，但氧对一切生物都会使其产生有毒害作用的代谢产物，如超氧基化合物与 H_2O_2，这两种代谢产物互相作用还会产生毒性很强的自由基 ·OH。自由基是一种强氧化剂，它与生物大分子相互作用，可产生生物分子自由基，从而对机体产生损伤或突变作用，直至死亡。氧之所以对专性厌氧微生物以外的其他 4 种类型微生物不产生致死作用，是因为它们具有超氧化物歧化酶，可催化超氧化基化合物分解，最终分解成水。

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A（*B. cereus* ANTI-8098A）为好氧细菌，生长过程需要空气的供给，不同的通气量使得培养基中的溶氧量不同，影响到好气细菌的生长。为了解通气量对生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 生长的影响，寻找最适于该菌生长发育的通气量，为其工业发酵供气的选择提供参考，特设计如下实验。

2. 研究方法

从蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 斜面培养基上挑一环菌苔，接入 100ml 的无菌水中，用混匀器混匀。在 250ml 的锥形瓶中分别装入 15ml、25ml、35ml、50ml 的培养基后高温灭菌，测定 pH 后，分别接入 1ml 的菌液，在 30℃、200r/min 旋转式摇床发酵，每个处理重复 3 次，分别于 18h、24h、48h 取样测定 pH、OD 值，发酵于 48h 结束，应用平板稀释活芽胞测定法计算菌体数。

3. 通气量与 pH 和 OD 值的关系

实验结果见表 1-11，4 种不同装量处理相比，生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 在摇床发酵过程中，15ml 组在 18h 时 pH 没有下降，保持 7.0，而其他 3 种装量都下降到 6.8 以下；在 24h 时除 50ml 处理 pH 不变外，其他 3 种处理的 pH 都有所上升，以 15ml 组上升最大，pH 达 7.7；在 48h 时，各处理组 pH 都上升，其中 15ml 组升至 8.5，25ml 组升至 7.8，35ml 和 50ml 组却只有 7.5。根据对以往生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 正常生长过程中 pH 变化的研究表明，15ml 处理的 pH 比较正常。在各处理发酵过程中，OD 值变化范围较小，为 0.81～0.99，说明发酵过程中营养的分解和利用处于动态平衡。实验结果表明，通气量对生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的生长能力有显著影响，通气量高的组（15ml）菌体数达（30.4±1.2367）$\times 10^8$CFU/ml，是通气量低的组（50ml）的 3.2 倍，分别比中等通气量组 25ml 和 35ml 生长能力提高 63.4%和 90%。按 15～25ml 装瓶量进行生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的发酵，能够满足培养基溶氧量的需求，有利于生防菌的生长（表 1-11）。

表 1-11　不同通气量对生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 生长的影响

处理/ml	pH			OD 值			菌体数/（$\times 10^8$CFU/ml）
	18h	24h	48h	18h	24h	48h	
15	7.0	7.7	8.5	0.99	0.96	0.96	30.4±1.2367A
25	6.8	7.0	7.8	0.89	0.91	0.86	18.6±0.9321B
35	6.4	6.6	7.5	0.89	0.88	0.87	16.0±0.7463C
50	6.0	6.0	7.5	0.81	0.84	0.80	9.4±0.3812D

注：同一栏内，带相同的小写字母在 Duncan’s 新复极差测验的多重比较 $P<0.05$ 时没有差异

三、温度对芽胞杆菌生长的影响

1. 概述

根据微生物生长的最适温度不同，可以将微生物分为嗜冷、兼性嗜冷、嗜温、嗜热和超嗜热等 5 种不同的类型。它们都有各自的最低、最适和最高生长温度范围，嗜冷微生物生长最低温度为<0℃，最适 15℃，最高 20℃；兼性嗜冷微生物生长最低温度为 0℃，最适 20～30℃，最高 30℃；嗜温微生物生长最低温度为 15～20℃，最适 20～45℃，最高>45℃；嗜热微生物生长最低温度为 45℃以下，最适 55～65℃，最高 80℃；超嗜热或嗜高温微生物生长最低温度为 65℃以下，最适 80～90℃，最高>100℃。

温度的变化都会对每种类型微生物的代谢过程产生影响，通过改变它们的生长速率，适应温度的变化而生存。例如，嗜冷芽胞杆菌生长最低温度–10℃，最适温度 23～24℃，最高温度 28～30℃；大肠杆菌生长最低温度 10℃，最适温度 37℃，最高温度 45℃。

温度对微生物生长的影响具体表现在：①影响酶活性，微生物生长过程中所发生的一系列化学反应绝大多数是在特定酶催化下完成的，每种酶都有最适的酶促反应温度，温度变化影响酶促反应速率，最终影响细胞物质合成；②影响细胞质膜的流动性，温度高流动性大，有利于物质的运输，温度低流动性降低，不利于物质运输，因此温度变化影响营养物质的吸收与代谢产物的分泌；③影响物质的溶解度，物质只有溶于水才能被机体吸收或分泌，除气体物质外，温度上升则物质的溶解度增加，温度降低则物质的溶解度降低，最终影响微生物的生长。

以地衣芽胞杆菌为例，地衣芽胞杆菌是芽胞杆菌中具有较大应用潜力的菌种之一，在植物病害防治（李玉峰等，2009；唐丽娟等，2005；来航线等，2004；Batrakov *et al.*，2003）、动物饲料（马鑫等，2011；戴求仲等，2011）和医药（马树宏，2008）等行业均取得了较好的应用研究成果。菌株 FJAT-4 是本研究室从发生枯萎病的田块分离得到的一株地衣芽胞杆菌（郑雪芳等，2006），试验表明该菌株对尖孢镰刀菌具有较强的抑制作用，具备开发成生防菌剂的潜在优势。

作物枯萎病是由尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）侵染引起的一种毁灭性土传性病害，该病害在世界范围内广泛发生，可危害番茄、辣椒、棉花、西瓜、黄瓜等 100 多种植物（张志忠等，2005），导致植株枯死，给农作物生产造成严重损失。以瓜类枯萎病为例，发病地块一般减产 10%～30%，严重地块可达 50%～60%，甚至绝收（郝晓娟等，2005）。目前，在枯萎病的防治上，由于病原菌的多样性和变异性，尚缺乏有效的化学药剂和抗病品种，轮作抗病方法也因耕地资源的限制而不易实施。因此，利用微生物及其代谢产物进行的生物防治研究，是枯萎病防治的一个重要研究方向，其中芽胞杆菌便是被广泛利用的一类微生物（余超等，2010；郝晓娟等，2007；车建美等，2010；付业勤等，2009；葛慈斌等，2009）。为了探索地衣芽胞杆菌 FJAT-4 的生长特性及其抑菌作用的浓度效应和温度效应，以期为生防菌剂的研制和应用提供参考，作者测定了不同温度下菌株 FJAT-4 的生长状况及其对尖孢镰刀菌抑制作用的差异，现将结果报道如下。

2. 研究方法

（1）菌株与培养基

供试的生防菌地衣芽胞杆菌 FJAT-4 为本研究室分离、鉴定、保存的菌株，平板培养用营养琼脂培养基（即 NA 培养基：牛肉膏 0.3%、蛋白胨 1.0%、NaCl 0.5%、琼脂 1.8%，pH7.2），摇瓶培养用 BPY 培养基（蛋白胨 1.0%、牛肉浸膏 0.5%、酵母浸出物 0.3%、葡萄糖 0.5%、NaCl 0.5%、pH7.2）；指示菌西瓜枯萎病尖孢镰刀菌 FJAT-135 是由本实验室从福建省永泰县患病的西瓜植株上分离而得到，培养基为土豆汁-蔗糖琼脂（PDA）培养基。

（2）地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌落生长特性

接种活化后的菌株 FJAT-4 于 BPY 培养基，30℃、200r/min 振荡培养，48h 后停止培养，用血球计数板测定培养液的菌体数；取少量的培养液，用无菌水稀释成菌体数约为 3.0×10^2CFU/ml 的菌悬液，吸取菌悬液 0.2ml，涂布于不同的 NA 培养基平板上；另用接种环沾取菌株 FJAT-4 培养液原液，划线接种在 NA 培养基平板上；分别将平板放置在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃的培养箱内培养；各处理设 3 个重复，在接种后的 24h、48h、72h 和 96h 观察菌落生长情况，并从涂布接种的平板上，随机选取 10 个单菌落，测量其直径，分析温度对该菌株菌落生长的影响。

（3）地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌体生长温度动力学分析

从活化菌株 FJAT-4 的 NA 培养基平板上挑取菌落，悬浮于无菌水中，制成菌体数约 4.3×10^8CFU/ml 的菌悬液；各取菌悬液 2.0ml，接入 BPY 培养基（装瓶量为 25ml/250ml 三角瓶），分别放置在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃的温度条件下，200r/min 振荡培养；于开始培养后的 0h、6h、12h、24h、36h、48h、60h、72h 取样，用稀释涂布平板法计算培养液中的活菌数；各处理设 3 个重复，分析菌株 FJAT-4 在不同温度下的菌体生长动力学特性。

（4）地衣芽胞杆菌 FJAT-4 对尖孢镰刀菌 FJAT-135 抑制作用的浓度效应分析

取不同温度下培养 72h 的地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液，并用无菌水稀释 100 倍，试验各培养液原液和 100 倍稀释液对菌株 FJAT-135 的抑制作用；抑菌试验参照郝变青等（2001）的方法，略加修改后进行，即分别将生防菌培养液原液、100 倍稀释液与冷却至 50℃熔融态的 PDA 固体培养基以 1∶9 相混合，摇匀，倒平板，以未接种生防菌的液体培养基与 PDA 混合倒成的平板为 CK；待平板凝固后，在平板中央接入一块预先培养 7d 的直径为 0.6cm 的病原菌菌片，倒置在 28℃培养箱内培养；于处理后 6d 用十字形测量法测量病原菌的菌落直径，计算抑菌率。每处理及对照均重复 3 次，用 DPS 统计软件进行统计分析。抑菌率计算公式：

抑菌率=（CK 菌落直径−处理组菌落直径）/（CK 菌落直径−0.6）×100%

（5）地衣芽胞杆菌 FJAT-4 对尖孢镰刀菌 FJAT-135 抑制作用的温度效应分析

取地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液（菌体数约 1.0×10^8CFU/ml），与冷却至 50℃熔融态的 PDA 固体培养基以 1∶9 相混合，摇匀，倒平板，接入病原菌菌片，分别将培养基平板倒置在 15℃、20℃、25℃、30℃和 35℃的培养箱内培养；于处理后的 4d、6d、8d 用

十字形测量法测量病原菌的菌落直径，计算抑菌率。每处理及对照均重复 3 次，用 DPS 统计软件进行统计，分析菌株 FJAT-4 对菌株 FJAT-135 抑制作用的温度效应。

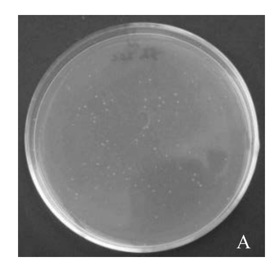
3. 温度对地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌落生长的影响

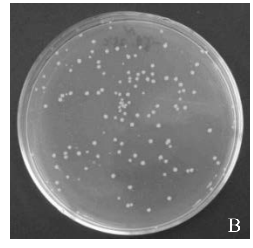
采用涂布法接种于NA培养基平板的菌株FJAT-4在不同温度下的菌落直径见表1-12和图 1-41。菌株 FJAT-4 在不同温度下的菌落直径差异显著（$P<0.05$），15℃条件下菌株几乎不生长，培养 72h 后平板上还未见有菌落长出；20℃下，培养 72h 后，菌落直径仅为 0.08cm；25℃条件下，培养 48h 时，平板上还看不到有菌落长出，72h 后菌落直径只有 0.18cm；30℃以上，菌株生长较为正常，并且随着温度的升高和培养时间的延长，菌落直径逐渐增大，但不同的温度下或者同一温度下的不同培养时间的菌落直径之间，差异均为显著。

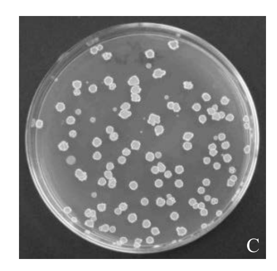
表 1-12　菌株 FJAT-4 在不同温度、不同时间培养后的菌落直径

时间/h	菌落直径/cm					
	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃	40℃
24	0.00aC	0.00bC	0.00bC	0.07cC	0.21cB	0.52cA
48	0.00aD	0.00bD	0.00bD	0.33bC	0.55bB	1.01bA
72	0.00aF	0.08aE	0.18aD	0.47aC	0.75aB	1.20aA

注：同一栏内，带相同的小写字母在 Duncan’s 新复极差测验的多重比较 $P<0.05$ 时没有差异；同一行内，带相同的大写字母在 Duncan’s 新复极差测验的多重比较 $P<0.05$ 时没有差异；下同







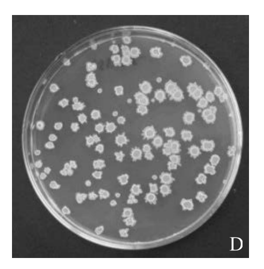


图 1-41　地衣芽胞杆菌 FJAT-4 在不同温度下培养 72h 后的菌落
A. 20℃；B. 25℃；C. 30℃；D. 35℃

划线接种于NA培养基平板的菌株FJAT-4在不同温度下的生长状况与用涂布法接种的相似，也表现为温度越高、时间越长，菌落越旺盛。用编号 0～4 表示菌株生长状况的级别，可将该菌株在不同温度、不同时间的生长状况归纳于表 1-13。以菌株生长级别为指标，以温度为样本，构建矩阵，以绝对值距离为尺度，用最短距离法对菌落生长温度范围进行系统聚类。绝对值距离矩阵见表 1-14，聚类结果见表 1-15，聚类图见图 1-42。当 λ=6 时，可将菌株的温度适应范围分为 3 类：在该温区内，菌株 FJAT-4 生长旺盛。地衣芽胞杆菌 FJAT-4 在 25℃以下生长缓慢，在 25℃以上，随着温度的升高，生长加速，最适宜的温度为 35～40℃。

表 1-13　地衣芽胞杆菌 FJAT-4 在不同温度、不同时间下生长状况

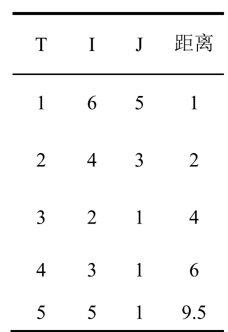
时间/h	不同温度下菌落生长状况					
	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃	40℃
24	0	0	1	2	3	4
48	0	1	2	2	4	4
72	0	2	2	3	4	4
96	1	2	3	3	4	4

注：0 为不生长；1 为极少量生长；2 为生长较差；3 为生长较好；4 为生长旺盛

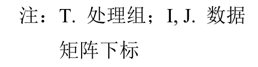
表 1-14　绝对值距离矩阵（下三角）

温度/℃	20	25	30	35	40
15	4				
20	7	3			
25	9	5	2		
30	14	10	7	5	
35	15	11	8	6	1

表 1-15　聚类结果



T	I	J	距离
1	6	5	1
2	4	3	2
3	2	1	4
4	3	1	6
5	5	1	9.5



注：T. 处理组；I, J. 数据矩阵下标

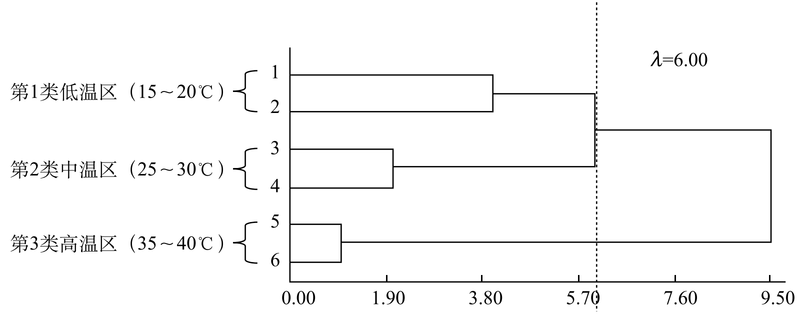


图 1-42　地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌落生长温度范围聚类分析

4. 地衣芽胞杆菌生长温度动力学

不同温度下，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养过程中培养液活菌数的变化情况见表 1-16。在 15℃，菌株 FJAT-4 几乎不生长，72h 后，培养液中的活菌数只有 1.0×10^8CFU/ml，为刚接种时的 3 倍，没有出现对数增长；在 20℃条件下，菌株生长较差，72h 后培养液的活菌数为 14.6×10^8CFU/ml；25℃和 30℃较适宜于该菌株的生长，培养 72h 后，培养液中活菌数达 35.4×10^8CFU/ml 和 37.8×10^8CFU/ml；35℃最适于菌株 FJAT-4 的生长，培养 36h 后，培养液中的活菌数达 62.2×10^8CFU/ml，之后活菌数呈现波浪式变化，至培养 72h 时的活菌数为 55.2×10^8CFU/ml，显著地比其他温度下的培养液活菌数大（P<0.05）。

表 1-16　不同时间、不同温度培养地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液中的活菌数

温度/℃		活菌数/（$\times10^8$CFU/ml）							
		0h	6h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
15	低温区	0.32	0.36	0.32	0.42	0.48	0.66	0.80	1.00d
20		0.32	0.40	0.38	0.98	2.50	11.20	17.00	14.60c
25	中温区	0.32	0.30	0.62	2.10	10.40	30.40	26.80	35.40b
30		0.32	0.46	2.40	5.80	13.20	27.20	20.40	37.80b
35	高温区	0.32	0.54	2.60	27.40	62.20	58.60	75.20	55.20a

用最小二乘法，对菌株 FJAT-4 在不同温度下生长曲线进行建模，结果表明（图 1-43），在 15℃时，该菌生长曲线呈直线型，方程为 $y = 0.0729x + 7.3721$（$R^2 = 0.9175$）；在 20℃时，该菌生长曲线呈直线型，方程为 $y = 0.2918x + 7.0007$（$R^2 = 0.9164$）；在 25℃时，该菌生长曲线呈对数型，方程为 $y = 7.068e^{0.0418x}$（$R^2 = 0.9235$）；在 30℃时，该菌生长曲线呈对数型，方程为 $y = 7.367e^{0.0366x}$（$R^2 = 0.9091$）；在 35℃时，该菌生长曲线呈指数型，方程为 $y = 1.3357\ln(x) + 7.2632$（$R^2 = 0.8949$）。

为划分菌株 FJAT-4 活菌数生长的温度范围，以时间为指标，以温度为样本，构建矩阵，以绝对值距离为尺度，用最短距离法对菌体数生长温度范围进行系统聚类。绝对值距离矩阵见表 1-17，聚类结果见表 1-18，聚类图见图 1-44。当 λ=81.17 时，可将该菌

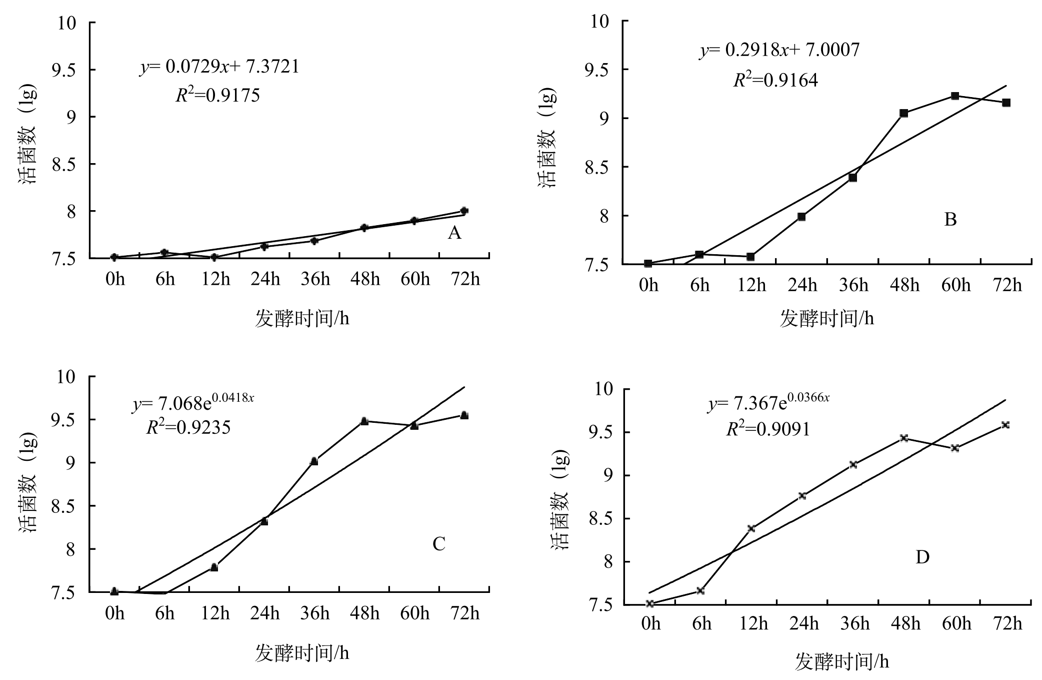


图 1-43　地衣芽胞杆菌 FJAT-4 在不同温度下的生长曲线

A. 15℃；B. 20℃；C. 25℃；D. 30℃；E. 35℃

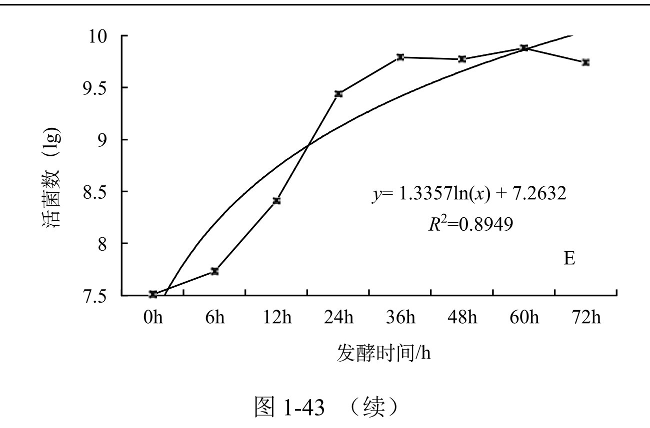


图 1-43 （续）

株的温度适应范围分为 3 类：第 1 类，15～20℃，为低温区，在该温区内，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 生长缓慢；第 2 类，25～30℃，为中温区，在该温区内，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 生长较良好；第 3 类，35℃，为高温区，在该温区内，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 生长最佳。

表 1-17　绝对值距离矩阵（下三角）

温度/℃	20	25	30	35
15	43.0200			
20	102.1000	59.1600		
25	103.2200	60.2000	20.4400	
30	277.7000	234.6800	175.7200	174.4800

表 1-18　聚类结果

T	I	J	距离
1	4	3	20.4400
2	2	1	43.0200
3	3	1	81.1700
4	5	1	215.6450

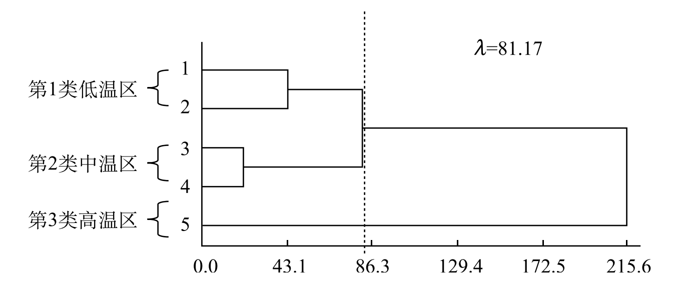


图 1-44　地衣芽胞杆菌 FJAT-4 生长的温度范围聚类

5. 温度对地衣芽胞杆菌抑菌作用的影响

实验结果见图 1-45。不同温度培养的地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 都具有较强的抑制作用，处理后 6d 抑制率都大于 69.9%；不同的处理之间，抑制率存在差异。25℃、30℃、35℃培养的地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌液原液对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制率，均显著大于 15℃和 20℃的培养液原液的抑制率（$P<0.05$）；20℃、30℃、35℃培养的地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌液 100 倍稀释液对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制率之间，不存在差异，但都大于 15℃和 25℃的培养液 100 倍稀释液的

抑制率。15℃、30℃、35℃培养的地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液原液与 100 倍稀释液对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用之间，不存在显著差异；20℃条件下培养液原液的抑制率显著小于 100 倍稀释液的抑制率，而 25℃条件下的培养液原液的抑制率则显著大于 100 倍稀释液的抑制率（$P<0.05$），但抑制率（77.1%和 70.6%）之间的差异，远比培养液中活菌数的差异（100 倍）小。

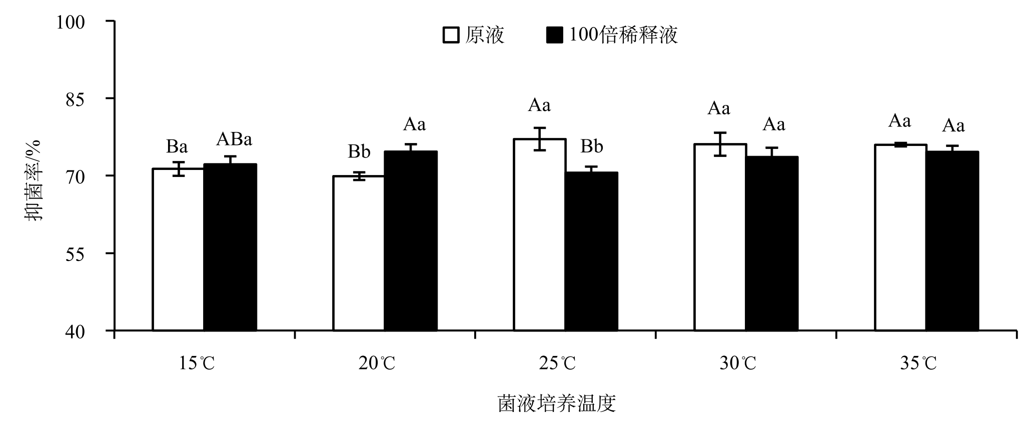


图 1-45　不同温度培养的地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用

带不同的大写字母表示在相同的浓度下、不同的培养温度之间存在显著差异，带不同的小写字母表示在相同的培养温度下、不同的浓度之间存在显著差异（Duncan's 新复极差测验的多重比较，$P<0.05$）

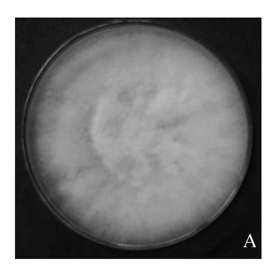
实验结果见表 1-19 和图 1-46。在 15～35℃的系列温度下，菌株地衣芽胞杆菌 FJAT-4 对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 都具有较强的抑制作用，但不同温度下的抑制率之间，存

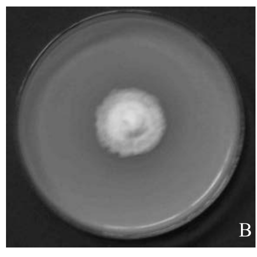
表 1-19　地衣芽胞杆菌 FJAT-4 在不同温度下对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用

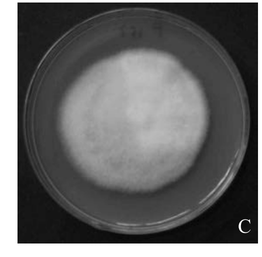
温度/℃	处理	处理后 4d		处理后 6d		处理后 8d	
		FJAT-135 菌落直径/cm	抑制率/%	FJAT-135 菌落直径/cm	抑制率/%	FJAT-135 菌落直径/cm	抑制率/%
15	生防菌	1.16	72.8bA	1.93	65.3cB	2.52	60.5cC
	CK	2.66	—	4.43	—	5.46	—
20	生防菌	1.99	69.8bcB	2.63	70.3bB	2.67	74.6bA
	CK	5.20	—	7.44	—	8.80	—
25	生防菌	2.13	69.3bcB	2.60	72.1bAB	2.79	73.3bA
	CK	5.54	—	7.76	—	8.80	—
30	生防菌	2.10	64.8cB	2.61	71.3bA	3.04	70.2bA
	CK	4.86	—	7.60	—	8.80	—
35	生防菌	1.17	80.9aA	1.52	79.1aA	1.45	82.8aA
	CK	3.58	—	5.01	—	5.53	—

注：带不同的大写字母表示不同的培养温度条件下对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用之间存在显著差异（Duncan's 新复极差测验的多重比较，$P<0.05$）；带不同的小写字母表示不同的培养温度条件下对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用之间存在显著差异（Duncan's 新复极差测验的多重比较，$P<0.01$）；—. 无数据

在着差异。处理后 4d，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液在 35℃条件下对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用最强，30℃时的抑制作用最弱；处理后 6d 和 8d，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 培养液在 35℃条件下的抑制率仍显著大于其他温度下的抑制率，15℃条件下的抑制率最小，而 20℃、25℃和 30℃条件下的抑制率之间则差异不大。比较同一处理在不同时间对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用，可以发现，在 15℃条件下，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 的抑菌作用随着处理时间的延长而减弱，且差异显著；在 20℃、25℃和 30℃下，抑菌作用随着处理时间的延长而增强，35℃条件下的抑菌作用则不会随处理时间的变化而产生显著的差异。







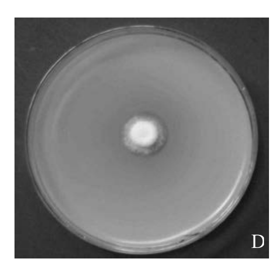


图 1-46　尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 在不同温度、不同处理下培养 8d 后的菌落

A. 25℃；B. 25℃；C. 35℃；D. 35℃

用最小二乘法，建立菌株 FJAT-4 在不同温度、不同时间处理后对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑菌率（Y）与温度（X_1）、处理时间（X_2）的二元线性回归方程，可得：$Y = 57.3333+0.5333X_1 + 0.1900X_2$（$R^2 = 0.4274$），方差分析见表 1-20，偏回归系数的显著性检验见表 1-21。表 1-20 中，F=4.4784>$F_{0.05（2，12）}$，P<0.05，即抑菌率与温度、处理时间之间存在显著的线性关系；表 1-21 中，$t_{b_{X_1}}$=2.9827>$t_{0.05（12）}$=2.179，$t_{b_{X_2}}$<$t_{0.05（12）}$，即抑菌率对温度的偏回归显著，对处理时间的偏回归不显著，这表明温度是对抑菌率线性影响的显著变量，而处理时间不是显著变量；通过比较温度、处理时间对抑菌率的通径系数（p）也可发现，p_{X_1}=0.6516>p_{X_2}=0.0536，表明温度对抑菌率的影响比处理时间对抑菌率的影响更重要。

表 1-20　二元线性回归方差分析表

变异来源	df	SS	MS	F 值	显著水平 P
回归	2	214.7773	107.3887	4.4784	0.03525
离回归	12	287.7520	23.9793		
总的	14	502.5293	35.8950		

表 1-21　偏回归方差分析表

变量	回归系数	标准系数	偏相关	标准误	t 值	显著水平 P
b_Y	57.3333			6.5698	8.7268	0
b_{X_1}	0.5333	0.6516	0.6525	0.1788	2.9827	0.0106
b_{X_2}	0.1900	0.0536	0.0707	0.7743	0.2454	0.8099

6. 讨论

微生物的生长易受温度、湿度等环境因素的影响。芽胞杆菌是单细胞型的生物，对温度的变化特别敏感，因此芽胞杆菌的生长具有明显的温度依赖性，有最低、最适宜和最高生长温度范围（Prescott *et al.*，2000）。黄曦等（2011）对有较强抑制荔枝霜疫霉和荔枝炭疽菌作用的枯草芽胞杆菌 ON-6 的培养条件进行初步研究，结果表明，该菌株的最佳培养温度 32～34℃；章蕴慧和纪兆林（2002）研究报道地衣芽胞杆菌 W10 的最适培养温度为 27～30℃；纪明山和王毅婧（2011）发现地衣芽胞杆菌 SDYT-79 菌株的最佳发酵培养温度为 24℃，20℃以下及 32℃以上的温度均不利于该菌株的生长；此外，胶冻样芽胞杆菌 PS04、枯草芽胞杆菌 BSW03、地衣芽胞杆菌 TS-01 的最适生长温度分别为 30℃、28℃和 40℃（张璐等，2011；谷春涛，2004）。由此可见，不同菌株的最佳培养温度均有不同，且差距较大；但较少见到有关芽胞杆菌的菌落生长与菌体量生长对温度的适应性是否一致方面的报道。芽胞杆菌的菌落形态是分类的依据之一（布坎南和吉本斯，1984），菌落生长通常是质量性状，表现在菌落的有无和大小上，而菌体生长是数量性状，常作为菌株生长速度的计量指标，都具有生物学特性上的研究意义。本研究对地衣芽胞杆菌 FJAT-4 在不同温度下的菌落、菌体生长的测定结果表明，菌株 FJAT-4 的菌落、菌体的生长明显受温度的影响，但表现出相似的温度适应性，即在 20℃以下的环境中生长缓慢，菌体数呈直线型增长；在 25～30℃时生长较良好，菌体数呈对数型增长，最佳的生长温度为 35～40℃。

尽管温度对地衣芽胞杆菌 FJAT-4 的生长有着重要的影响，不同温度下发酵的培养液菌体数量差异较大，但不同培养液对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 抑制率之间的差异远小于培养液之间的活菌数差异，而且同一培养液经稀释后，对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 抑制率的下降幅度也远小于活菌数的降低程度。这表明，在不同温度下培养的菌株 FJAT-4 抑菌性状不会发生明显变化，同时也进一步明确了地衣芽胞杆菌 FJAT-4 具有较强的抑制枯萎病菌的作用，只要培养液中存在一定的活菌量，就能起到较好的抑菌效果。

环境条件影响生物农药的防治效果（万利和高翠希，2005）。纪明山等（2011）研究发现，温度及湿度对枯草芽胞杆菌 B36 可湿性粉剂防治番茄灰霉病的效果具有较大影响，当相对湿度在 90%，日温 30℃和夜温 20℃条件下，对番茄灰霉病的保护和防治效果分别为 82.48%和 63.01%，防效较好；在日温 25℃和夜温 15℃条件下的保护和防治效果分别仅为 45.06%和 23.85%。本研究结果也表明，温度也影响地衣芽胞杆菌 FJAT-4 对尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的抑制作用，从总体上看，在 15℃条件下，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌株对尖孢镰刀菌 FJAT-135 菌株的抑制作用相对最弱，抑菌作用还随着处理时间的延长而减弱；在 20～30℃条件下，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 菌株的抑菌作用相对较强，而且在处理期内，抑菌作用还有随着处理时间的延长而增强的趋势；在 35℃条件下，地衣芽胞杆菌 FJAT-4 的抑菌作用最强。这可能是因为尖孢镰刀菌的适宜生长温度比地衣芽胞杆菌的低，在温度较低（20℃以下）时不利于地衣芽胞杆菌 FJAT-4 的生长，较适宜于尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的生长；而温度较高（30℃以上）时适宜于地衣芽胞杆菌 FJAT-4 的生长，但不利于尖孢镰刀菌菌株 FJAT-135 的生长。

四、pH 对芽胞杆菌生长的影响

1. 概述

微生物生长过程中机体内发生的绝大多数的反应是酶促反应，而酶促反应都有一个最适 pH 范围，在此范围内只要条件适合，酶促反应速率最高，微生物生长速率最大，因此微生物生长也有一个最适生长的 pH 范围。此外微生物生长还有一个最低与最高的 pH 范围，低于或高出这个范围，微生物的生长受抑制，不同微生物生长的最适、最低与最高的 pH 范围不同。例如，细菌最适、最低与最高的 pH 范围分别为 3～5、6.5～7.5、8～10，酵母菌最适、最低与最高的 pH 范围分别为 2～3、4.5～5.5、7～8，霉菌最适、最低与最高的 pH 范围分别为 1～3、4.5～5.5、7～8。pH 通过影响细胞质膜的透性、膜结构的稳定性和物质的溶解性或电离性来影响营养物质的吸收，从而影响微生物的生长速率。质子是唯一一种不带电子的阳离子，它在溶液里能迅速地与水结合成水合氢离子（H_3O^+等）。在偏碱性条件下，OH^-占优势，水合氢离子和 OH^-对营养物质的溶解度和离解状态、细胞表面电荷平衡和细胞的胶体性质等方面均会产生重大影响；在酸性条件下 H^+可以与营养物质结合，并能从可交换的结合物或细胞表面置换出某些阳离子，从而影响细胞结构的稳定性；同时由于 pH 较低，CO_2 溶解度降低，某些金属离子如 Mn^{2+}、Ca^{2+}、Mo^{2+}等溶解度增加，导致它们在溶液中的浓度增加，从而对机体产生不利的作用。

利用微生物生态学原理，筛选不同特性的芽胞杆菌，为利用功能性微生物制剂提供菌种，发酵生产植物育苗基质、生物肥料、生物饲料和生物能源等，通过资源转化和利用增加绿肥还田，保护生态环境。采用不同 pH 对芽胞杆菌 FJAT-8754 进行发酵实验，并通过平板涂布法测定发酵液中的活菌数，从菌株对碳源的利用情况和农业应用成本方面考虑选择合适的 pH，以提高活菌数，为将芽胞杆菌作为微生物菌剂应用于农业中奠定研究基础。

2. 研究方法

以解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens* FJAT-8754）为例，菌种：FJAT-8754 选自福建省农业科学院农业生物资源研究所菌种资源库。LB 固体培养基：酵母浸粉 5.0g、NaCl 5.0g、鱼粉蛋白胨 10.0g、琼脂粉 17g、水 1000ml，pH7.0～7.2。LB 液体培养基：酵母浸粉 5.0g、NaCl 5.0g、鱼粉蛋白胨 10.0g、水 1000ml，pH 7.0～7.2。发酵培养基：玉米淀粉 10.0g、鱼粉蛋白胨 10.0g、NaCl 4.0g、K_2HPO_4 0.5g、KH_2PO_4 0.5、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5g、$CaCl_2$ 0.2g，pH 分别调为：4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。种子液制备：用无菌接菌环从活化的平板上挑取单菌落，接种到装有 LB 液体培养基的三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 的恒温摇床中培养 10h 即作为种子液。发酵培养：用移液枪吸取 1ml 种子液（接种量为 2%）分别加入盛有 50ml 灭菌的 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 LB 液体培养基的三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养 36h。生物量测定：吸取 1ml 发酵液至装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-1} 浓度，进一步稀释成不同浓度，吸取 100μl 至相应浓度的平板上，涂布均匀并静置 30min。

每个梯度重复 3 次。置于 30℃恒温箱培养 1～2d。统计分析：统计平板上的菌落数，算出每一稀释度菌落的平均数。菌落数计算公式：每毫升发酵液中菌体数量＝同一稀释度的菌落平均数×稀释倍数。

3. 初始 pH 对芽胞杆菌生长的影响

将制备的种子液按 2%的接种量接种到 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的发酵培养基，于 30℃、170r/min 恒温摇床中培养 36h，用平板计数法测其发酵液中活菌数，结果见图 1-47。初始 pH 为 8.0 时，其发酵液中活菌体数最高，菌体数达 2.48×10^9 CFU/ml，当 pH 小于 6.0 和大于 9.0 时活菌数均较小，说明解淀粉芽胞杆菌菌株 FJAT-8754 的最适 pH 为 6.0～9.0。

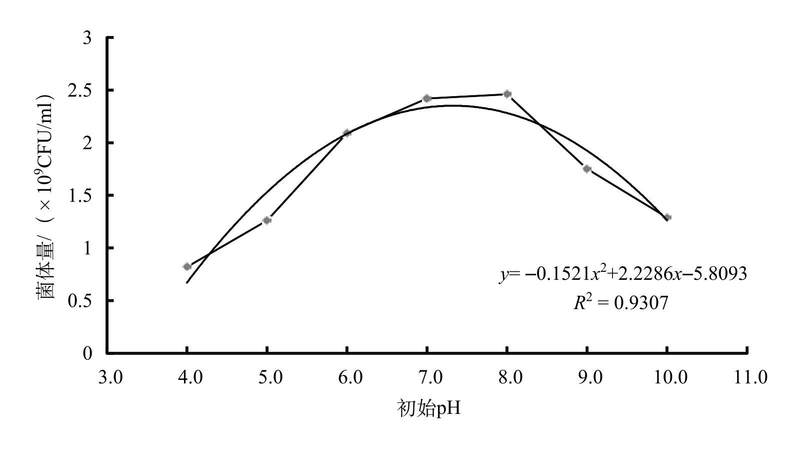


图 1-47　初始 pH 对芽胞杆菌生长的影响

4. 讨论

pH 是表征微生物生长及产物合成的重要参数之一，也是反映微生物代谢活动的综合性指标，它影响菌体细胞膜的电荷状况，从而影响微生物对培养基中营养物质的吸收及代谢产物和胞外蛋白的分泌，妨碍微生物新陈代谢的正常进行。由于摇瓶发酵过程中 pH 难以控制，因此只能控制发酵培养基的初始 pH。以不同初始 pH 的发酵培养基对芽胞杆菌 FJAT-8754 进行发酵培养，通过稀释涂布法测定发酵液中活菌体数，芽胞杆菌 FJAT-8754 的最适 pH 为 6.0～9.0，说明该菌适宜在中性偏碱的环境下生长，但有一定的耐酸性能。

五、通气量、pH、温度对芽胞杆菌生长的综合影响

在摇床上进行正交试验，对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 发酵的 pH、温度、通气量发酵条件，设计三因素水平 L_4（2^3）试验，以综合指数=菌体数×抑菌圈直径为指标，统计分析发酵的最佳条件。培养基配方为豆饼粉、玉米浆、玉米淀粉、蛋白胨、KH_2PO_4、$MgSO_4$、$CaCO_3$。通气量由摇瓶装液量控制，设 25ml 和 50ml 两个水平；温度设 28℃和

34℃两个水平；pH 设 7.5 和 8.0 两个水平；试验设重复 3 个，振荡培养 48h 后，取发酵液进行抑菌试验，测量抑菌圈直径，发酵液稀释 100 倍，利用血球计数板测定其菌体数，计算综合指数。

试验结果见表 1-22。从表 1-22 可知，不同通气量、pH、温度对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 发酵液的菌体数和发酵液的抑菌圈直径有极显著的影响（P<0.01）。处理 3 发酵液菌体数为最高，达 38×10^8CFU/ml，抑菌圈直径为最大，达 13mm，综合指数为 494，为最大。而处理 2 中发酵液菌体数最低，为 30×10^8CFU/ml，处理 1 中的发酵液抑菌圈直径最低，为 7mm，最高发酵液菌体数和抑菌圈直径分别为最低的 1.3 倍和 1.8 倍。通过因素分析可知，通气量对发酵的影响最大，其次是温度和 pH。试验最优的培养条件为通气量 25ml 装瓶量、pH 为 7.5、温度为 28℃。

表 1-22　通气量、pH、温度对菌株 ANTI8098 抑菌圈直径的影响 L_4（2^3）

处理	装量	pH	温度	含菌数/（×10^8CFU/ml）	抑菌圈直径/mm	综合指数
1	（1）50ml	（1）7.5	（1）34	34	7	238 A
2	（1）50ml	（2）8.0	（2）28	30	8	240 A
3	（2）25ml	（1）7.5	（2）28	38	13	494 B
4	（2）25ml	（2）8.0	（1）34	38	11	418 C

注：带不同的大写字母表示不同处理之间存在显著差异（Duncan's 新复极差测验的多重比较，P<0.05）

综合 pH、温度、通气量条件，最优的培养条件为通气量 25ml 装瓶量、pH 为 7.5、温度为 28℃。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养过程中，pH 从培养初始的 7.0，逐步上升到 84h 的 8.5。OD_{650} 值从培养初始的 0.56，逐步上升到 36h 的 1.10，而后逐渐下降，84h 降到 0.85。总糖量从初始的 1.23%，逐步下降，36h 降到 0.677%，48h 后，微弱上升到 0.735%。从 12h 开始，菌体数达 6.72×10^8CFU/ml，而后逐渐增加，48h 达高峰，菌体数达 58.2×10^8CFU/ml，随后菌体数逐渐下降（图 1-48），种群生长模型为：

$$N = \frac{46.51}{1 + e^{4.0829 - 0.1490t}}$$

六、讨论

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养的最佳培养基配方为豆饼粉 1.5%、玉米淀粉 4.5%、酵母粉 4.5%、蛋白胨 4.5%。按 5～15ml 装瓶量进行生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的发酵，能够满足培养基溶氧量的需求，有利于生防菌的生长。通气量对发酵的影响最大，其次是温度和 pH。

芽胞杆菌作为青枯病生防菌，有过许多报道。杨合同和任欣正（1990）用芽胞杆菌 B130 制成的泥炭制剂对生姜青枯病在小区试验中取得了 100%的防病效果，增产 34.87%～48.15%。印度 Anuratha 和 Gnanamanickam（1990）用 *Bacillus* sp. B33 和菌株 B36 防治香蕉、茄子和番茄青枯病，分别取得了温室试验 50%、61%和 95%的防效，田间试验 50%、49%和 36%的防效，同时植株鲜重和生物产值也得到提高。芽胞杆菌

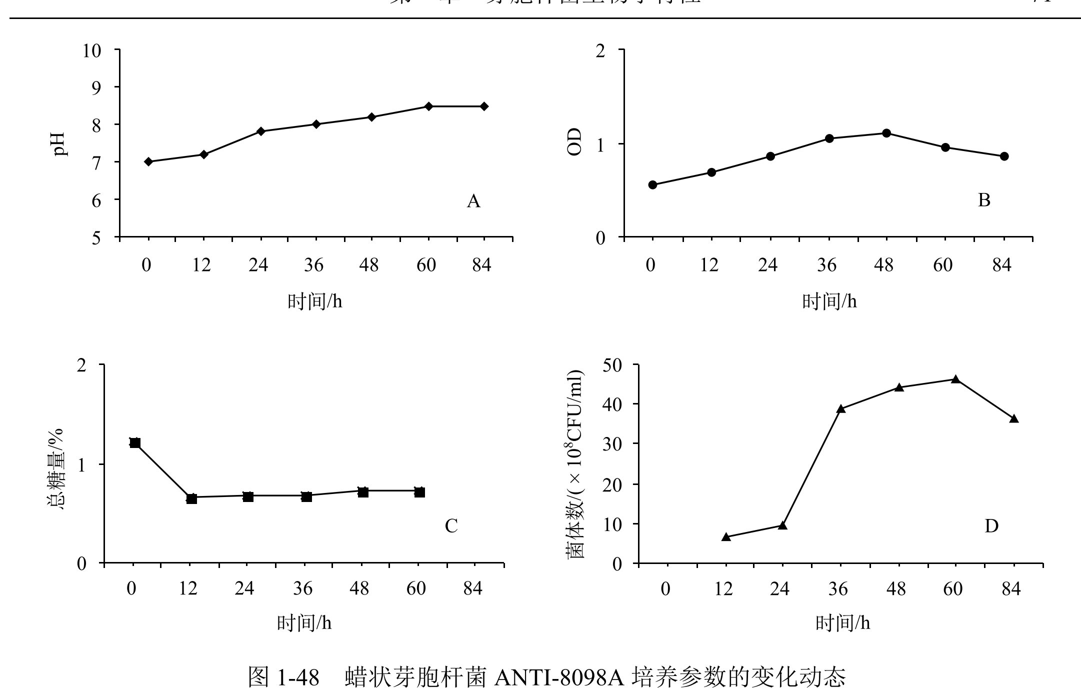


图 1-48　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养参数的变化动态

A．蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养过程 pH 的变化；B. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养过程 OD 值的变化；C. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养过程总糖量的变化；D. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养过程菌体数的变化

ANTI-8098A 对青枯病有较好的防效（张彦等，2011），通过正交试验，结果表明蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养基的最佳配比为豆饼粉 1.5%、玉米淀粉 4.5%、酵母粉 4.5%、蛋白胨 4.5%，酵母粉和蛋白胨提供氮源，玉米淀粉提供碳源，豆饼粉既提供氮源又提供碳源。不同的芽胞杆菌，适应不同类型的碳源和氮源。多粘类芽胞杆菌菌株 KCTC 8648P 是青枯病的生防菌之一，在研究其培养基营养时，比较了 6 种碳源（蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、乳糖、可溶性淀粉）和 6 种氮源，结果表明，蔗糖是最好的碳源，硝基氮优于氨基氮或尿素（Lee *et al.*，1997）。

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 最佳摇床培养的 pH 为 7.5，与报道的多粘类芽胞杆菌最佳的 pH 为 7～8 相近（Lee *et al.*，1997），高于芽胞杆菌 B130 最佳 pH 6（郭坚华和潘登明，1995）。最佳的通气量为 25ml 装瓶量，最佳培养温度为 28℃。不同的培养方法对芽胞杆菌的发酵效率差异甚大，连续流加法发酵多粘类芽胞杆菌产生丁烯乙二醇（2,3-butylene glycol）的能力比批次发酵高 50 倍，同时加入 75ml 的乙酸钾盐离子使碳水化合物转化为乙二醇的能力从 17%提高到 68%（Shazer and Speckman，1984）。

刘建国和裴炎（2001）对蜡状芽胞杆菌 S1 的培养条件进行了研究，最佳的培养温度为 30℃，最佳的初始培养基 pH 为 7.0，最佳的蛋白胨含量为 2%，最佳的葡萄糖含量为 3%，28℃培养，虽然生长量不如 30℃，但是对于产生抑制物质是最佳温度。并指出蜡状芽胞杆菌生长分为两个阶段，第一阶段 0～23h，菌株不产生新型抗真菌多肽 APS，第二阶段 24～48h，是菌株产生 APS 的阶段，所以，在培养过程第一阶段以 30℃为佳，第二阶段以 28℃为佳。张竹青和罗宽（1999）对青枯病生防菌菌株的培养进行了研究，研究结果表明，菌株湘 2-3 最佳培养温度为 30～32℃，最佳的培养基初始 pH 为 7.2～8.0，

菌体达生长量最大的时间为 20～24h。研究的 3 个不同菌株对培养条件有较大差异。虽然，研究未鉴定出菌株的种，但从培养基和培养条件看为芽胞杆菌。

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 培养至 48h 时，菌体数量达到高峰，为 58.2×10^8CFU/ml，随后菌体数逐渐下降。菌体数与抑菌能力没有必然的联系，在试验中，第 6 号培养基配方产生的菌体数为 34.7×10^8CFU/ml，而抑菌圈仅为 5mm，相比之下，第 2 号培养基配方产生的菌体数为 28.1×10^8CFU/ml，而抑菌圈则达 12mm，所以，评价发酵效果，用综合指数（综合指数=菌体数×抑菌圈直径）更加切合实际。对于一个特定的培养基配方，其发酵效果（抑菌能力）与发酵时间存在一定的正相关，芽胞杆菌 B130 在初期其抑菌活性随培养时间而增长，但 36h 后呈下降趋势。对蛋白质粗提液等的研究表明，B130 的抑菌物质成分复杂，但主要活性部分是蛋白质和多肽类物质（郭坚华和潘登明，1995）。

蜡状芽胞杆菌的种群生长具有一般生物种群生长的特性。当一个物种迁入一个新生态系统中后，其数量会发生变化。假设该物种的起始数量小于环境的最大容纳量，则数量会增长。该物种在此生态系统中有天敌，食物、空间等资源也不足（非理想环境），则增长函数满足逻辑斯谛方程，图像呈 S 形，此方程是描述在资源有限的条件下种群增长规律的一个最佳数学模型。以下简要介绍逻辑斯谛方程的原理、生态学意义及其应用。1838 年，比利时数学家 Pierre（1804～1849 年）研究人口增长的课题，提出了人口增长不但和现有人口相关，还和可用资源有关，即有一个人口的承载量，首先将营养关系反映到种群数学模型方面，是他首先导出了后来被广泛称为逻辑斯谛的方程，最初发表时称为 Verhulst 方程。但在当时并没有引起大家的注意，直到 1920 年，两位美国人口学家 Pearl 和 Reed 在研究美国人口问题时，再次提出这个方程，才开始流行，故现在文献中通常称为 Verhulst-Pearl 阻碍方程。之所以又称为逻辑斯谛方程是因为其有某种逻辑推理的含义。按现在的用语来说，它是一个说理模型，实际上是反映营养对种群增长的一种线性限制关系的说理模型。1963 年，洛伦兹发现确定性系统的随机行为，并且发现了这种随机行为对初值的敏感性。1975 年，美籍华人学者李天岩和数学家约克发表《周期中蕴含着混沌》的著名文章，揭示从有序到混沌的演化过程。这些内容都包含在逻辑斯谛差分方程中。1976 年，R.梅在英国《自然》杂志上发表了研究逻辑斯谛方程的成果——《表现非常复杂的动力学的简单数学模型》，引起学术界极大关注，内容已远远超越了生态学领域，揭示出逻辑斯谛方程深处蕴藏的丰富内涵。将逻辑斯谛方程解出来，可以得到：

$$P(t)=\frac{KPx^{rt}}{K+P\left(x^{rt}-1\right)} \tag{1-1}$$

式中，P_0 为初始值，很眼熟吧，变变形，是不是就类似开头提出的 Logistic 函数了，唯一不同的是系数有所变化。研究表明，蜡状芽胞杆菌的生长模型如下，符合 Logistic 函数。

$$N=\frac{46.51}{1+e^{4.0829-0.1490t}}$$

Logistic 函数或 Logistic 曲线是一种常见的 S 形函数，它是皮埃尔·弗朗索瓦·韦吕勒

（1844 年或 1845 年）在研究它与人口增长的关系时命名的。广义的 Logistic 曲线可以模仿一些人口增长情况（*P*）的 S 形曲线。起初阶段大致是指数增长，然后随着开始变得饱和，增加变慢；最后，达成熟时增加停止。Logistic 函数其实就是这样一个函数：

$$P(t)=\frac{1}{1+x^{-t}}$$

这个函数的曲线很像一个 S 形，所以又称为 sigmoid 曲线（S 形曲线）。逻辑斯谛方程即微分方程：

$$\frac{\mathrm{d}P}{\mathrm{d}t}=rP\left(1-\frac{p}{k}\right)$$

第四节　芽胞杆菌生长特性

一、概述

芽胞杆菌营养体约 30min 分裂增殖一次，营养、温度、pH、氧气、盐浓度等条件的改变会使芽胞和营养体转化。芽胞在适宜条件下一般 4～6h 萌发成为营养体，具有运动性。营养体能产酶，如蛋白酶、淀粉酶、葡聚糖酶、甘露聚糖酶、植酸酶等。芽胞杆菌对 pH、温度耐受性强，适用 pH 范围较宽，一般 pH2～10 都可以存活，最适生长 pH 为 7.2～7.5。部分芽胞杆菌可耐受 90～110℃的温度，抗逆性好。国内对 7 种芽胞杆菌生长特性进行过系统研究，现综述如下。

（1）地衣芽胞杆菌（*Bacillus licheniformis*）

研究了地衣芽胞杆菌对尖吻鲈（*Lates calcarifer*）的生长及消化酶活性的影响。地衣芽胞杆菌制剂（含量为 10×10^8CFU/g）分别以 0.0%（对照组）、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%和 0.6%的比例添加到饲料中，投喂初始体重为（17.47±0.19）g 的尖吻鲈，养殖时间 8 周。随着地衣芽胞杆菌添加量的增加，尖吻鲈的增重率和特定生长率逐渐增高，在 0.5%组达最大，增重率提高 9.77%，特定生长率提高 4.56%；同时该组的肥满度也显著高于对照组（$P<0.05$），尖吻鲈的增重率、特定生长率、饲料系数、存活率、脏体比和肝体比在各组间都没有显著差别，尖吻鲈的前肠蛋白酶在 0.2%组达最大，并显著高于对照组（$P<0.05$），其他组别及部位的消化酶则低于对照组或差异不显著。结果表明，地衣芽胞杆菌对尖吻鲈的生长有一定的促进作用，但此作用与消化酶变化相关不明显（李卓佳等，2011）。从健康猪生长的发酵床垫料中筛选到一株耐高温的高效降解菌 Y34，将其接种到猪粪水中反应 25d 后，对 COD 与 NH_3-N 降解率分别为 84.7%、83.59%。生长特性表明，其最适生长温度为 50℃。通过形态观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列比对，鉴定菌株 Y34 为地衣芽胞杆菌，其与地衣芽胞杆菌相似性为 99.0%。对此菌发酵过程中产酶情况进行研究，结果表明，在 50℃培养条件下，菌株 Y34 能够分泌过氧化氢酶、蛋白酶、脲酶，具有用于研制发酵床微生物制剂的潜力（尹红梅等，2012）。

（2）短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）

在烟草青枯病区采取健康烟草植株，从其茎秆内分离到 2 株对烟草青枯雷尔氏菌

（*Ralstonia solanacarum*）有强拮抗作用的内生菌株 009 和 011。形态观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列比对结果表明，菌株 009 和 011 均归属为短短芽胞杆菌，009、011 与短短芽胞杆菌（AY591911）相似性分别为 99.5%和 99.0%，GenBank 登录号分别为 DQ444284、DQ444285。生长特性研究结果表明，它们的最适生长 pH 分别为 6.5、7.5，最适生长温度分别为 25℃、30℃。温室内用淋根法分别先接种菌株 009 和 011，后接种病原菌，其防效分别为 87.25%和 52.30%。用菌株 009 和 011 菌液分别和烟草青枯病菌的混合液淋根，其防效明显低于前者。田间小区试验结果表明，菌株 011 的防效明显高于菌株 009 和农用链霉素（易有金等，2007）。

（3）解淀粉芽胞杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）

在解淀粉芽胞杆菌磷酸转移酶系统中，葡萄糖主要是由 *ptsGHI* 操纵子编码的酶 EI、HPr、EII^{Gkl} 转运入细胞，运用 PCR 技术，扩增出 *ptsG* 和 *ptsHI* 基因上下游的 DNA 片段，共约 1000bp。用融合 PCR 连接上下游片段后，再连接到温敏型质粒 pKS2 上，然后电转化到解淀粉芽胞杆菌 XH7 中，最终构成 *ptsHI* 基因缺陷株。实验结果显示：在 LB 培养基中，*ptsG* 及 *ptsHI* 基因缺陷株的生长状况与野生型菌株无明显差异；在含葡萄糖的 LB 培养基中，*ptsG* 基因缺陷株的最高菌密度比野生型菌株提高了 28%，且平稳期比野生型菌株要长，而 *ptsHI* 基因缺陷株的最高菌密度比野生型菌株降低了约 32%，与其在 LB 中的生长状况基本一致；*ptsG* 和 *ptsHI* 缺陷株及野生型菌株经鸟苷发酵实验后，*ptsG* 基因缺陷株的鸟苷产量比野生型菌株提高了约 24%，*ptsHI* 基因缺陷株的鸟苷产量则比野生型菌株降低了约 82%。以上结果表明：解淀粉芽胞杆菌 *ptsG* 基因缺陷株具有良好的生长能力和产物合成能力（杨慧林等，2012）。

（4）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

从广西大学、中国农业科学院植物保护研究所黄萎病、枯萎病发病较轻的试验棉田根围土中筛选出 5 株拮抗性能较高的细菌，其中一株菌株 S6 经过 16S rDNA 鉴定为枯草芽胞杆菌。经过测定，菌株 S6 的最适生长温度为 28℃，最适 pH 为 7，对 NaCl 的耐受达 10%（王娜和许雷，2007）。用浸种、浸根、淋根、伤茎、伤叶和喷雾等接种方法测试枯草芽胞杆菌 B-001 入侵烟草植株的途径，发现该菌可通过自然孔口和伤口入侵寄主植物；取接种植株的茎部组织切片在电镜下观察，发现该菌株在烟草的维管束和细胞内定殖。生长特性研究结果表明，该菌株最适生长 pH 为 7.5，最适生长温度为 30℃，48～96h 内处于稳定生长期（易有金等，2007）。利用发酵罐研究了 32℃、37℃和 42℃培养温度对枯草芽胞杆菌菌体生长及芽胞形成的影响。结果表明，37℃能够获得最大菌量，42℃开始形成芽胞的时间最早；37℃和 42℃条件下生长的延滞期比 32℃明显缩短。利用摇瓶培养研究了糖类、醇类和盐类碳源对菌体生长性能的影响。结果表明，各类碳源中葡萄糖、环状糊精、马铃薯淀粉、甘油、甘露醇明显缩短了培养的延滞期；不同碳源对发酵液菌量影响差异很大，柠檬酸钠、乙酸钠和环状糊精的最高菌量分别比基础培养基提高了 1.32 倍、1.09 倍、1.02 倍，马铃薯淀粉、葡萄糖和甘露醇处理分别提高了 98.1%、78.6%和 74.0%，可溶性淀粉处理菌提高 1.4%，甘油处理提高了 7.7%。在各类碳源中只有盐类碳源即柠檬酸钠和乙酸钠能正常形成芽胞（岳寿松等，2011）。从油田地层水中筛选分离得到一株能够产生表面活性剂的细菌，经鉴定为枯草芽胞杆菌。分析了该菌株

的生理形态和生长特性，以及该菌株代谢产生的生物表面活性剂的性质。薄层色谱与原位水解显色和红外光谱分析表明，培养后菌株代谢产生的生物表面活性为脂肽。它能使水的表面张力临界胶束浓度为0.025mg/ml（吕应年等，2005）。试验分析了一株肠源枯草芽胞杆菌生长特性，耐酸、耐胆盐、耐高温和耐重金属性能及产蛋白酶、淀粉酶的能力。结果表明：菌株最大生长浓度出现在22h左右。菌株在pH3.0营养肉汤培养基中培养3h，存活率为58.6%，培养时间延长至6h，存活率仍能达47.5%。在胆盐浓度为0.3%时，培养后枯草芽胞杆菌存活率为65.5%，8h后的存活率仍能达40.4%。在90℃条件下，处理10min成活率为61.8%，处理20min后仍能达33.3%。当Cu离子和Zn离子浓度为500mg/L时，菌株生长量相当于对照的107.6%和86.7%。菌株培养48h后上清液的淀粉酶活性为 1.89U。结果表明，本株枯草芽胞杆菌具备较好的生长与抗逆特性和较高的酶活性，具备作为益生菌的潜在特质（汪海峰等，2012）。

（5）凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）

以高产南美白对虾池塘中分离的芽胞杆菌为研究对象，通过筛选和形态学、理化特性及核酸特征测定，鉴定为凝结芽胞杆菌（编号为ZJ0519），并对其生长特性进行了初步研究。结果表明，菌株ZJ0519生长最适温度为30～45℃，最适初始pH为6.0～7.0，并具有广阔的温度适应性。此外，菌株ZJ0519发酵液代谢产物有机酸组分分析显示，主要为乳酸和乙酸，其中乳酸产量可达（7.65±0.14）g/L；为凝结芽胞杆菌作为益生菌在水产养殖池塘微生态调节中的应用奠定了基础（王彦波，2009）。通过比较凝结芽胞杆菌TQ33 和肠道微生物或其他芽胞杆菌对盐、抗生素、高温培养及可发酵性糖浓度的适应能力和生长特性，最终确立了分离鉴别菌株TQ33的方法，即利用改进后的BCP培养基，在 50℃条件下培养 48～72h，计数黄色菌落，并借助革兰氏染色和形态观察鉴别菌株TQ33。同时试验还发现，小鼠服用菌株TQ33制剂后，可以刺激肠道中其他乳酸菌的生长（路福平和戚薇，1998）。

（6）嗜热芽胞杆菌（*B. thermophilus*）

将采集于清源山、华大后山果园、华大南浦果园、实验室附近等多处的高温堆肥样品在60℃、pH7.0条件下进行富集培养，其中南浦果园堆肥样品菌体长势较好，菌株呈暗绿色；逐步提高培养基中甘油浓度（0.5～3g/L），进行菌株产甘油脱氢酶（GDH）的驯化培养与复筛，经8个批次的GDH酶活达0.201U/ml的棕色菌株，编号TB8-5；经镜检分析同时结合菌落生长特性并经生理生化实验反应鉴定，初步判断筛选出的菌株属嗜热芽胞杆菌属；菌株发酵液中产物组分鉴定为1,3-二羟基丙酮（dihydroxyacetone），含量为0.597mg/ml，相应的GDH酶活也最高，其最适反应温度为50℃，Zn^{2+}对酶活有一定的促进作用（彭益强等，2007）。

（7）苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）

将携带基因*cry3A*的质粒通过电脉冲法转入苏云金芽胞杆菌野生菌株YBT-803-1后，对该菌的生长产生了一定的影响。结果表明，转入*cry3A*基因后，转化子BMBY-003的生长速度与初发菌株YBT-803-1相比虽无明显变化，但产生杀虫晶体蛋白的时间较初发菌株延迟6～8h，且最适温度提高为33℃，而对葡萄糖等14种碳源和谷氨酸等12种氮源的利用能力与初发菌株无明显差异（乐超银和徐世谨，2001）。

二、芽胞杆菌国内采集菌株的生长特性

芽胞杆菌的生长特性也是作为种类鉴定特性之一，其试验方法参照东秀珠和蔡妙英（2008）编的《常见细菌系统鉴定手册》。温度梯度测定，设有 5℃、10℃、15℃、30℃、37℃、50℃、55℃，采用连续划线法取幼龄菌种划线培养，设 3 个重复，2d 后观察结果。pH 梯度测定，设有 4.5、5.7、7.2、8.0、9.5，取幼龄菌种划线接种，设 3 个重复，2d 后观察结果。耐盐性测定，NA 培养基中加入不同浓度的 NaCl（2%、5%、7%、10%），接种培养，设 3 个重复，培养 3d 和 7d，目测生长情况。

对国内分离的 9 个芽胞杆菌种类 130 个菌株进行生长特性（温度、pH、耐盐性）研究，用 0 表示反应阴性，1 表示反应阳性，测定结果见表 1-23。从表中可以看出，同种芽胞杆菌不同样本来源的菌株，对生长条件反应存在异质性，一般来说，在最适生长因子范围，同种芽胞杆菌不同菌株差异不大，如深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*），检测的 15 个菌株在 15～37℃温度下，都能生长，表现一致，在 10℃温度下大部分能生长，有 3 个菌株 FJAT-4620、FJAT-4643、FJAT-4751 不能生长。同样在 5℃、50℃、55℃温度下，有的菌株可以生长，有的菌株无法生长。芽胞杆菌对 pH 的适应性异质性较小，大部分被测的菌株在 pH4.5 条件下不能生长，而大部分菌株在 pH5.7、7.2、8.0、9.5 条件下可以生长。

表 1-23　芽胞杆菌国内采集菌株的生长特性

菌株编号	种名	温度/℃							pH					NaCl/%			
		5	10	15	30	37	50	55	4.5	5.7	7.2	8.0	9.5	2	5	7	10
FJAT-4399	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4403	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4404	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4470	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
FJAT-4483	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4495	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4520	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4580	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4582	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4589	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4590	*B. atrophaeus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4620	*B. atrophaeus*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4643	*B. atrophaeus*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4750	*B. atrophaeus*	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
FJAT-4751	*B. atrophaeus*	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0

续表

菌株编号	种名	温度/℃							pH					NaCl/%			
		5	10	15	30	37	50	55	4.5	5.7	7.2	8.0	9.5	2	5	7	10
FJAT-4382	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
FJAT-4386	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4398	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4409	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4414	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4418	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4419	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4476	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4478	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4521	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4542	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4556	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4558	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4577	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4609	*B. cereus*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4610	*B. cereus*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4633	*B. cereus*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4634	*B. cereus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4645	*B. cereus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4655	*B. cereus*	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4656	*B. cereus*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4415	*B. licheniformis*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4431	*B. licheniformis*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4646	*B. licheniformis*	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4648	*B. licheniformis*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4394	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
FJAT-4395	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
FJAT-4396	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
FJAT-4401	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4406	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4407	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4412	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4416	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4417	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4420	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0

续表

菌株编号	种名	温度/℃							pH					NaCl/%			
		5	10	15	30	37	50	55	4.5	5.7	7.2	8.0	9.5	2	5	7	10
FJAT-4421	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4422	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4425	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4426	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4427	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4434	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4437	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4466	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4467	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4468	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4469	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4488	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4489	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4497	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4501	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4503	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4509	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4510	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4511	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4514	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4524	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4525	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4545	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4550	*B. megatherium*	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4551	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4552	*B. megatherium*	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4565	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4568	*B. megatherium*	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4570	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4579	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4584	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4585	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4596	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4599	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4607	*B. megatherium*	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

续表

菌株编号	种名	温度/℃							pH					NaCl/%			
		5	10	15	30	37	50	55	4.5	5.7	7.2	8.0	9.5	2	5	7	10
FJAT-4608	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4612	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4621	*B. megatherium*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4640	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4641	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4716	*B. megatherium*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4737	*B. megatherium*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
FJAT-4388	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4390	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
FJAT-4392	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
FJAT-4527	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4540	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4541	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4547	*B. mycoides*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4636	*B. mycoides*	0	1		1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4721	*B. mycoides*	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4749	*B. mycoides*	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4753	*B. mycoides*	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
FJAT-4400	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4479	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4500	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4512	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4563	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4598	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4605	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4657	*B. pumilus*	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4385	*L. sphaericus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
FJAT-4557	*L. sphaericus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4678	*L. sphaericus*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
FJAT-4746	*L. sphaericus*	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
FJAT-4410	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4428	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4465	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4475	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4481	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0

续表

菌株编号	种名	温度/℃							pH					NaCl/%			
		5	10	15	30	37	50	55	4.5	5.7	7.2	8.0	9.5	2	5	7	10
FJAT-4492	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4581	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4604	*B. subtilis*	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4471	*P. polymyxa*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
FJAT-4472	*P. polymyxa*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
FJAT-4537	*P. polymyxa*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4539	*P. polymyxa*	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4543	*P. polymyxa*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4544	*P. polymyxa*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-4575	*P. polymyxa*	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

注： 0 表示反应阴性，1 表示反应阳性

芽胞杆菌对盐浓度的适应性差异较大，分为几种类型：①同种芽胞杆菌不同菌株对盐浓度适应性不同，如深褐芽胞杆菌 FJAT-4520 在盐浓度 2%、5%、7%、10%条件下可以生长，菌株 FJAT-4403 在盐浓度 2%、5%、7%条件下可以生长，菌株 FJAT-4399 在盐浓度 2%、5%条件下可以生长，菌株 FJAT-4470 仅在盐浓度 2%条件下可以生长；②芽胞杆菌对盐浓度的适应性由小到大，如在盐浓度 2%、5%、7%、10%条件下，有的菌株适应盐浓度 2%，有的菌株适应 2%、5%，有的菌株适应 2%、5%、7%，有的菌株适应 2%、5%、7%、10%；③很少一部分芽胞杆菌对盐浓度的适应性表现为跳跃性，如巨大芽胞杆菌菌株 FJAT-4394、FJAT-4395、FJAT-4396 在 2%盐浓度条件下不能生长，而盐浓度 5%条件下却能生长，其原因有待进一步研究。

芽胞杆菌对生长条件的适应性表现出菌株群体概率分布特性。例如，深褐芽胞杆菌，对 5℃、10℃、15℃、30℃、37℃、50℃、55℃温度生长适应的概率分别为 0.06、0.80、1.00、1.00、1.00、0.73、0.20（表 1-24）。深褐芽胞杆菌对于 5℃温度适应，不是能不能生长的问题，而是有 6%的菌株可以在该温度生长。

以芽胞杆菌国内采集菌株的生长特性概率值为矩阵（表 1-24），以生长特性为指标，以种类为样本，利用欧氏距离，以类平均法进行系统聚类，分析结果见图 1-49。当 $\lambda=22.5$ 时，被测芽胞杆菌可以分为 3 类。

第 1 类包括了蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）、球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）、蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）。这些种类共同的特点是对高温适应性较差，只有 1%的菌株在 55℃高温下能生长；对高浓度盐适应性中等，25%～71%的菌株在 10%盐浓度下能生长。

第 2 类包括了深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）。这些种类共同的特点是对高温适应性较强，有 12%～20%的菌株在 55℃高温下能生长；对高浓度盐适应性较强，45%～75%的菌株在 10%盐浓度下能生长。

表 1-24　芽胞杆菌国内采集菌株的生长特性概率值

编号	种名	温度/℃						
		5	10	15	30	37	50	55
1	*B. megatherium*	0.07	0.94	1.00	1.00	1.00	0.32	0.01
2	*P. polymyxa*	0.00	0.85	0.85	1.00	1.00	0.00	0.00
3	*B. mycoides*	0.18	0.90	0.90	1.00	1.00	0.18	0.00
4	*L. sphaericus*	0.25	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
5	*B. cereus*	0.00	0.76	1.00	1.00	1.00	0.23	0.00
6	*B. atrophaeus*	0.06	0.80	1.00	1.00	1.00	0.73	0.20
7	*B. pumilus*	0.00	0.87	1.00	1.00	1.00	0.75	0.12
8	*B. licheniformis*	0.25	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.25
9	*B. subtilis*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	0.25

编号	种名	pH				
		4.5	5.7	7.2	8.0	9.5
10	*B. megatherium*	0.00	0.98	1.00	1.00	1.00
11	*P. polymyxa*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
12	*B. mycoides*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
13	*L. sphaericus*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
14	*B. cereus*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
15	*B. atrophaeus*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
16	*B. pumilus*	0.00	0.87	1.00	1.00	1.00
17	*B. licheniformis*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
18	*B. subtilis*	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

编号	种名	NaCl/%			
		2	5	7	10
19	*B. megatherium*	0.94	0.98	0.50	0.46
20	*P. polymyxa*	1.00	0.85	0.71	0.71
21	*B. mycoides*	0.72	0.72	0.45	0.36
22	*L. sphaericus*	0.75	0.50	0.50	0.25
23	*B. cereus*	0.95	0.95	0.57	0.47
24	*B. atrophaeus*	1.00	0.80	0.53	0.46
25	*B. pumilus*	1.00	1.00	0.75	0.75
26	*B. licheniformis*	1.00	1.00	0.00	0.00
27	*B. subtilis*	1.00	1.00	0.25	0.25

第 3 类包括了地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）。这些种类共同的特点是对高温适应性较强，有 25%的菌株在 55℃高温下能生长；对高浓度盐适应性较差，只有 0～25%的菌株在 10%盐浓度下能生长。

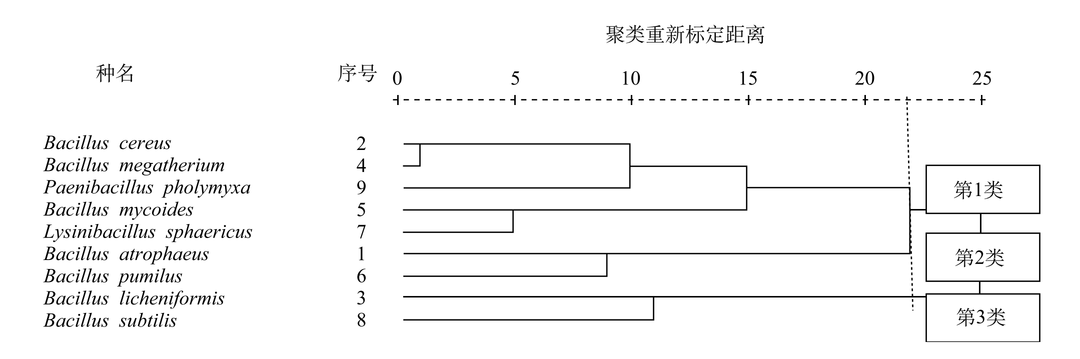


图 1-49　芽胞杆菌国内采集菌株的生长特性聚类

三、芽胞杆菌标准菌株的生长特性

1. 生长特性的测定

芽胞杆菌标准菌株分别引自 DSMZ、CCUG、ATCC，其库存菌株编号、原始菌株编号、种名、中文名称见表 1-25。对 87 种芽胞杆菌生长特性包括温度（最低、平均、最高）、pH（最低、平均、最高）、盐浓度（最低、平均、最高）进行分析，结果见表 1-26。从表 1-26 可以看出，芽胞杆菌生长特性适应范围可分为 3 个类型：①广适应型；②中等适应型；③窄适应型。

表 1-25　芽胞杆菌标准菌株信息

	库存菌株编号	原始菌株编号	种名	中文名称
1	FJAT-14221	DSM 18954	*B. acidiceler*	酸快生芽胞杆菌
2	FJAT-14829	DSM 14745	*B. acidicola*	酸居芽胞杆菌
3	FJAT-14209	DSM 23148	*B. acidiproducens*	产酸芽胞杆菌
4	FJAT-10013	DSM 8721	*B. agaradhaerens*	黏琼脂芽胞杆菌
5	FJAT-276	ATCC 27647	*B. alacalphilus*	嗜碱芽胞杆菌
6	FJAT-2286	DSM 16976	*B. alkalitelluris*	碱土芽胞杆菌
7	FJAT-10025	DSM 21631	*B. altitudinis*	高地芽胞杆菌
8	FJAT-8754	CCUG 28519	*B. amyloliquefaciens*	解淀粉芽胞杆菌
9	FJAT-14220	DSM 21047	*B. aryabhattai*	阿氏芽胞杆菌
10	FJAT-8755	CCUG 28524	*B. atrophaeus*	深褐芽胞杆菌
11	FJAT-8757	CCUG 7412	*B. badius*	栗褐芽胞杆菌
12	FJAT-10043	DSM 15601	*B. bataviensis*	巴达维亚芽胞杆菌
13	FJAT-14214	DSM 19037	*B. beijingensis*	北京芽胞杆菌
14	FJAT-14268	DSM 17376	*B. boroniphilus*	嗜硼芽胞杆菌
15	FJAT-14236	DSM 18926	*B. butanolivorans*	食丁酸芽胞杆菌
16	FJAT-10029	DSM 17613	*B. carboniphilus*	嗜碳芽胞杆菌
17	FJAT-10015	DSM 2522	*B. cellulosilyticus*	解纤维芽胞杆菌

续表

	库存菌株编号	原始菌株编号	种名	中文名称
18	FJAT-8760	CCUG 7414	*B. cereus*	蜡状芽胞杆菌
19	FJAT-14272	DSM 16189	*B. cibi*	食物芽胞杆菌
20	FJAT-8761	CCUG 7416	*B. circulans*	环状芽胞杆菌
21	FJAT-8762	CCUG 47262	*B. clausii*	克劳氏芽胞杆菌
22	FJAT-520	AS1. 2009	*B. coagulans*	凝结芽胞杆菌
23	FJAT-10017	DSM 2528	*B. cohnii*	科氏芽胞杆菌
24	FJAT-14222	DSM 17725	*B. decisifrondis*	腐叶芽胞杆菌
25	FJAT-14274	DSM 14890	*B. decolorationis*	脱色芽胞杆菌
26	FJAT-10044	DSM 15600	*B. drentensis*	钻特省芽胞杆菌
27	FJAT-10010	DSM 13796	*B. endophyticus*	内生芽胞杆菌
28	FJAT-274	ATCC 29313	*B. fastidiosus*	苛求芽胞杆菌
29	FJAT-8765	CCUG 28525	*B. flexus*	坚强芽胞杆菌
30	FJAT-10032	DSM 16014	*B. fordii*	福氏芽胞杆菌
31	FJAT-10033	DSM 16012	*B. fortis*	强壮芽胞杆菌
32	FJAT-8766	CCUG 28888	*L. fusiformis*	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌
33	FJAT-10034	DSM 15595	*B. galactosidilyticus*	解半乳糖芽胞杆菌
34	FJAT-10035	DSM 15865	*B. gelatini*	明胶芽胞杆菌
35	FJAT-14270	DSM 18134	*B. ginsengihumi*	人参土芽胞杆菌
36	FJAT-519	ATCC 23301	*B. globisporus*	圆孢芽胞杆菌
37	FJAT-10037	DSM 16731	*B. hemicellulosilyticus*	解半纤维素芽胞杆菌
38	FJAT-14233	DSM 6951	*B. horikoshii*	堀越氏芽胞杆菌
39	FJAT-14211	DSM 16318	*B. humi*	土地芽胞杆菌
40	FJAT-14212	DSM 15820	*B. indicus*	印度芽胞杆菌
41	FJAT-14252	DSM 21046	*B. isronensis*	印空研芽胞杆菌
42	FJAT-14210	DSM 16467	*B. koreensis*	韩国芽胞杆菌
43	FJAT-14240	DSM 17871	*B. kribbensis*	韩研所芽胞杆菌
44	FJAT-14213	DSM 19099	*B. lehensis*	列城芽胞杆菌
45	FJAT-275	ATCC 14707	*B. lentimorbus*	缓病芽胞杆菌（缓死芽胞杆菌）
46	FJAT-8771	CCUG 7422	*B. licheniformis*	地衣芽胞杆菌
47	FJAT-14206	DSM 18845	*B. luciferensis*	路西法芽胞杆菌
48	FJAT-14248	DSM 16346	*B. macyae*	马氏芽胞杆菌
49	FJAT-14235	DSM 16204	*B. marisflavi*	黄海芽胞杆菌
50	FJAT-8773	CCUG 49529	*B. massiliensis*	马塞芽胞杆菌
51	FJAT-8774	CCUG 1817	*B. megatherium*	巨大芽胞杆菌
52	FJAT-10005	DSM 9205	*B. mojavensis*	莫哈维芽胞杆菌
53	FJAT-14208	DSM 16288	*B. muralis*	壁芽胞杆菌

续表

	库存菌株编号	原始菌株编号	种名	中文名称
54	FJAT-14258	DSM 19154	*B. murimartini*	马丁教堂芽胞杆菌
55	FJAT-8775	DSM 2048	*B. mycoides*	蕈状芽胞杆菌
56	FJAT-14216	DSM 15077	*B. nealsonii*	尼氏芽胞杆菌
57	FJAT-14217	DSM 17723	*B. niabensis*	农研所芽胞杆菌
58	FJAT-14202	DSM 2923	*B. niacini*	烟酸芽胞杆菌
59	FJAT-14227	DSM 15603	*B. novalis*	休闲地芽胞杆菌
60	FJAT-14201	DSM 18869	*L. odysseyi*	奥德赛赖氨酸芽胞杆菌
61	FJAT-2235	DSM 23308	*B. okhensis*	奥哈芽胞杆菌
62	FJAT-14823	DSM 13666	*B. okuhidensis*	库恩芽胞杆菌
63	FJAT-14224	DSM 9356	*B. oleronius*	蔬菜芽胞杆菌
64	FJAT-2285	DSM 19096	*B. panaciterrae*	人参地块芽胞杆菌
65	FJAT-10053	ATCC 14576	*V. pantothenticus*	泛酸枝芽胞杆菌
66	FJAT-14218	DSM 16117	*B. patagoniensis*	巴塔哥尼亚芽胞杆菌
67	FJAT-14237	DSM 8725	*B. pseudalcaliphilus*	假嗜碱芽胞杆菌
68	FJAT-14225	DSM 12442	*B. pseudomycoides*	假蕈状芽胞杆菌
69	FJAT-8778	CCUG 28882	*B. psychrosaccharolyticus*	冷解糖芽胞杆菌
70	FJAT-14255	DSM 11706	*B. psychrotolerans*	耐寒芽胞杆菌
71	FJAT-8779	CCUG 26016	*B. pumilus*	短小芽胞杆菌
72	FJAT-14825	DSM 17057	*B. ruris*	农庄芽胞杆菌
73	FJAT-14260	DSM 19292	*B. safensis*	沙福芽胞杆菌
74	FJAT-14262	DSM 18680	*B. selenatarsenatis*	硒砷芽胞杆菌
75	FJAT-14261	DSM 15326	*B. selenitireducens*	还原硒酸盐芽胞杆菌
76	FJAT-14231	DSM 16464	*B. seohaeanensis*	西岸芽胞杆菌
77	FJAT-14257	DSM 18868	*B. shackletonii*	沙氏芽胞杆菌
78	FJAT-2295	DSM 30646	*B. simplex*	简单芽胞杆菌
79	FJAT-14822	DSM 13140	*B. siralis*	青贮窖芽胞杆菌
80	FJAT-14232	DSM 15604	*B. soli*	土壤芽胞杆菌
81	FJAT-14256	DSM 13779	*B. sonorensis*	索诺拉沙漠芽胞杆菌
82	FJAT-9	FJAT-9	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌
83	FJAT-8784	CCUG163	*B. subtilis*	枯草芽胞杆菌
84	FJAT-14	FJAT-14	*B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌
85	FJAT-14844	DSM 11031	*B. vallismortis*	死谷芽胞杆菌
86	FJAT-14842	DSM 9768	*B. vedderi*	威氏芽胞杆菌
87	FJAT-14850	DSM 18898	*B. vietnamensis*	越南芽胞杆菌

表 1-26　芽胞杆菌标准菌株的生长特性

	库存菌株编号	种名	温度/℃			pH			盐浓度/%		
			最低	平均	最高	最低	平均	最高	最低	平均	最高
1	FJAT-14221	*B. acidiceler*	20.00	30.00	40.00	5.60	7.00	8.50	0.00	1.50	5.00
2	FJAT-14829	*B. acidicola*	15.00	30.00	45.00	3.50	5.00	7.00	0.00	1.00	2.00
3	FJAT-14209	*B. acidiproducens*	25.00	40.00	55.00	6.00	7.00	7.50	0.00	1.50	3.00
4	FJAT-10013	*B. agaradhaerens*	10.00	25.00	40.00	8.00	9.00	10.00	0.00	5.00	10.00
5	FJAT-276	*B. alacalphilus*	10.00	25.00	40.00	8.00	9.00	9.00	0.00	3.50	7.00
6	FJAT-2286	*B. alkalitelluris*	15.00	27.50	40.00	7.00	8.00	11.00	0.00	2.00	7.00
7	FJAT-10025	*B. altitudinis*	8.00	26.50	45.00	5.00	7.00	8.00	0.00	1.00	2.00
8	FJAT-8754	*B. amyloliquefaciens*	20.00	30.00	40.00	6.00	7.00	8.00	0.00	2.50	5.00
9	FJAT-14220	*B. aryabhattai*	10.00	23.50	37.00	6.00	8.00	10.00	0.00	5.80	11.60
10	FJAT-8755	*B. atrophaeus*	10.00	30.00	50.00	6.00	8.00	10.00	0.00	3.50	8.00
11	FJAT-8757	*B. badius*	10.00	30.00	50.00	6.00	7.00	8.00	0.00	3.50	7.00
12	FJAT-10043	*B. bataviensis*	30.00	40.00	50.00	6.00	8.00	9.00	0.00	1.50	3.00
13	FJAT-14214	*B. beijingensis*	7.00	26.00	45.00	5.50	8.00	11.00	0.00	6.00	12.00
14	FJAT-14268	*B. boroniphilus*	16.00	25.00	37.00	6.50	8.00	9.00	0.00	3.50	7.00
15	FJAT-14236	*B. butanolivorans*	5.00	25.00	45.00	6.00	7.00	8.80	0.50	2.75	5.00
16	FJAT-10029	*B. carboniphilus*	20.00	30.00	40.00	6.00	7.00	7.00	0.00	3.50	7.00
17	FJAT-10015	*B. cellulosilyticus*	20.00	30.00	40.00	8.00	9.00	10.00	0.00	6.00	12.00
18	FJAT-8760	*B. cereus*	10.00	30.00	50.00	6.00	8.00	10.00	0.00	4.00	8.00
19	FJAT-14272	*B. cibi*	10.00	27.50	45.00	5.50	7.00	8.00	0.00	6.00	12.00
20	FJAT-8761	*B. circulans*	30.00	30.00	50.00	6.00	8.00	9.00	0.00	2.50	5.00
21	FJAT-8762	*B. clausii*	20.00	35.00	50.00	6.00	8.00	9.00	0.00	5.00	10.00
22	FJAT-520	*B. coagulans*	30.00	35.00	40.00	5.00	8.00	10.00	0.00	1.00	2.00
23	FJAT-10017	*B. cohnii*	10.00	25.00	40.00	9.00	10.00	10.00	0.00	2.50	5.00
24	FJAT-14222	*B. decisifrondis*	25.00	32.50	40.00	7.00	8.00	9.00	0.00	1.00	2.00
25	FJAT-14274	*B. decolorationis*	5.00	22.50	40.00	7.00	7.00	8.00	0.00	5.00	10.00
26	FJAT-10044	*B. drentensis*	30.00	40.00	50.00	6.00	8.00	9.00	0.00	1.50	3.00
27	FJAT-10010	*B. endophyticus*	10.00	28.00	45.00	6.00	7.00	8.00	0.00	5.00	10.00
28	FJAT-274	*B. fastidiosus*	10.00	25.00	40.00	8.00	9.00	9.00	0.00	2.50	5.00
29	FJAT-8765	*B. flexus*	20.00	25.00	30.00	5.00	7.00	9.00	0.00	5.00	10.00
30	FJAT-10032	*B. fordii*	10.00	20.00	30.00	6.00	8.00	9.00	0.00	3.50	7.00
31	FJAT-10033	*B. fortis*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	9.00	0.00	2.50	7.00
32	FJAT-8766	*L. fusiformis*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	10.00	0.00	3.50	7.00
33	FJAT-10034	*B. galactosidilyticus*	30.00	35.00	40.00	6.00	8.00	10.00	0.00	3.00	6.00
34	FJAT-10035	*B. gelatini*	40.00	46.50	55.00	5.00	7.00	9.00	0.00	2.50	5.00
35	FJAT-14270	*B. ginsengihumi*	30.00	40.00	50.00	6.00	7.00	7.00	0.00	5.00	10.00

续表

	库存菌株编号	种名	温度/℃			pH			盐浓度/%		
			最低	平均	最高	最低	平均	最高	最低	平均	最高
36	FJAT-519	*B. globisporus*	0.00	15.00	25.00	6.00	6.00	7.00	0.00	0.83	3.00
37	FJAT-10037	*B. hemicellulosilyticus*	10.00	25.00	40.00	8.00	10.00	11.00	0.00	6.00	12.00
38	FJAT-14233	*B. horikoshii*	20.00	25.00	40.00	7.00	8.00	9.00	0.00	3.50	7.00
39	FJAT-14211	*B. humi*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	9.00	0.00	3.50	7.00
40	FJAT-14212	*B. indicus*	20.00	25.00	30.00	6.00	7.00	7.00	0.00	1.00	2.00
41	FJAT-14252	*B. isronensis*	5.00	21.00	37.00	6.00	8.00	10.00	0.00	2.90	5.80
42	FJAT-14210	*B. koreensis*	15.00	31.50	48.00	4.50	7.00	9.00	0.00	1.50	3.00
43	FJAT-14240	*B. kribbensis*	13.00	30.00	47.00	4.00	7.00	9.50	0.00	2.50	5.00
44	FJAT-14213	*B. lehensis*	10.00	23.50	37.00	7.00	9.00	11.00	0.00	6.00	12.00
45	FJAT-275	*B. lentimorbus*	20.00	27.50	35.00	5.50	6.00	6.50	0.00	1.00	2.00
46	FJAT-8771	*B. licheniformis*	20.00	35.00	50.00	6.00	7.00	7.00	0.00	3.50	7.00
47	FJAT-14206	*B. luciferensis*	20.00	30.00	40.00	6.00	7.00	8.00	0.00	3.00	6.00
48	FJAT-14248	*B. macyae*	20.00	30.00	40.00	7.00	8.00	8.40	0.00	1.00	2.00
49	FJAT-14235	*B. marisflavi*	10.00	25.00	40.00	5.00	7.00	9.00	0.00	5.00	2.00
50	FJAT-8773	*B. massiliensis*	25.00	35.00	45.00	6.00	8.00	9.00	0.00	2.50	5.00
51	FJAT-8774	*B. megatherium*	20.00	30.00	40.00	6.00	7.00	7.00	0.00	3.50	7.00
52	FJAT-10005	*B. mojavensis*	10.00	30.00	50.00	6.00	7.00	7.00	0.00	5.00	10.00
53	FJAT-14208	*B. muralis*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	9.00	0.00	3.50	7.00
54	FJAT-14258	*B. murimartini*	10.00	20.00	30.00	7.00	9.00	10.00	0.00	2.00	4.00
55	FJAT-8775	*B. mycoides*	30.00	35.00	40.00	6.00	8.00	10.00	0.00	3.00	6.00
56	FJAT-14216	*B. nealsonii*	30.00	42.50	55.00	6.00	8.00	10.00	0.00	3.50	7.00
57	FJAT-14217	*B. niabensis*	25.00	32.50	40.00	6.00	8.00	9.00	0.00	2.50	5.00
58	FJAT-14202	*B. niacini*	10.00	25.00	40.00	7.00	8.00	8.00	0.00	1.00	2.00
59	FJAT-14227	*B. novalis*	30.00	40.00	50.00	5.00	7.00	9.00	0.00	2.00	4.00
60	FJAT-14201	*L. odysseyi*	20.00	35.00	50.00	6.00	8.00	10.00	0.00	2.50	5.00
61	FJAT-2235	*B. okhensis*	25.00	32.50	40.00	7.00	9.00	10.00	0.00	5.00	10.00
62	FJAT-14823	*B. okuhidensis*	30.00	42.50	55.00	6.00	8.00	10.00	0.00	5.00	10.00
63	FJAT-14224	*B. oleronius*	30.00	40.00	50.00	6.00	7.00	8.00	0.00	2.50	5.00
64	FJAT-2285	*B. panaciterrae*	20.00	32.50	45.00	5.00	7.00	8.00	0.00	0.50	1.00
65	FJAT-10053	*V. pantothenticus*	28.00	37.00	45.00	5.00	6.00	7.00	0.00	5.00	10.00
66	FJAT-14218	*B. patagoniensis*	10.00	25.00	40.00	7.00	9.00	10.00	0.00	7.50	15.00
67	FJAT-14237	*B. pseudalcaliphilus*	10.00	25.00	40.00	8.00	9.00	10.00	0.00	5.00	10.00
68	FJAT-14225	*B. pseudomycoides*	15.00	27.50	40.00	5.00	7.00	9.00	0.00	1.00	2.00
69	FJAT-8778	*B. psychrosaccharolyticus*	5.00	17.50	30.00	5.00	6.00	7.00	0.00	1.00	2.00
70	FJAT-14255	*B. psychrotolerans*	5.00	17.50	30.00	6.00	7.00	8.00	0.00	1.00	7.00

续表

	库存菌株编号	种名	温度/℃			pH			盐浓度/%		
			最低	平均	最高	最低	平均	最高	最低	平均	最高
71	FJAT-8779	*B. pumilus*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	9.00	0.00	2.00	7.00
72	FJAT-14825	*B. ruris*	30.00	35.00	40.00	6.00	9.00	11.00	0.00	2.00	4.00
73	FJAT-14260	*B. safensis*	10.00	30.00	50.00	6.00	8.00	9.00	0.00	5.00	10.00
74	FJAT-14262	*B. selenatarsenatis*	25.00	32.50	40.00	7.50	8.00	9.00	0.00	2.50	5.00
75	FJAT-14261	*B. selenitireducens*	20.00	27.50	35.00	8.00	9.00	10.00	0.00	5.00	10.00
76	FJAT-14231	*B. seohaeanensis*	15.00	32.50	50.00	5.00	7.00	8.00	0.00	1.50	3.00
77	FJAT-14257	*B. shackletonii*	20.00	35.00	50.00	5.00	7.00	9.00	0.00	2.50	5.00
78	FJAT-2295	*B. simplex*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	9.00	0.00	2.50	5.00
79	FJAT-14822	*B. siralis*	20.00	35.00	50.00	5.00	7.00	9.00	0.00	1.00	2.00
80	FJAT-14232	*B. soli*	30.00	35.00	40.00	5.00	7.00	8.00	0.00	5.00	10.00
81	FJAT-14256	*B. sonorensis*	10.00	30.00	50.00	5.00	7.00	8.00	0.00	1.00	2.00
82	FJAT-9	*L. sphaericus*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	10.00	0.00	2.50	5.00
83	FJAT-8784	*B. subtilis*	20.00	30.00	40.00	6.00	7.00	8.00	0.00	3.50	7.00
84	FJAT-14	*B. thuringiensis*	20.00	30.00	40.00	6.00	8.00	10.00	0.00	3.50	7.00
85	FJAT-14844	*B. vallismortis*	10.00	30.00	50.00	5.00	7.00	8.00	0.00	5.00	10.00
86	FJAT-14842	*B. vedderi*	25.00	35.00	45.00	9.00	10.00	10.00	0.00	3.50	7.00
87	FJAT-14850	*B. vietnamensis*	10.00	25.00	40.00	7.00	9.00	10.00	0.00	3.50	7.00

2. 温度适应性

对芽胞杆菌温度适应性分析可以看出，有些种类属于温度广适应型，即最高温度与最低温度之差达 30℃以上，如 *B. acidicola* 生长的最低温度为 15℃和最高温度为 45℃，*B. vallismortis* 生长的最低温度为 10℃和最高温度为 50℃，*B. shackletonii* 生长的最低温度为 20℃和最高温度为 50℃。

有些种类属于温度中等适应型，即最高温度与最低温度之差为 20～30℃，如 *B. acidiceler* 生长的最低温度为 20℃和最高温度为 40℃，*B. fordii* 生长的最低温度为 10℃和最高温度为 30℃，*B. novalis* 生长的最低温度为 30℃和最高温度为 50℃。

有些种类属于温度窄适应型，即最高温度与最低温度之差为 10℃以下，如 *B. flexus* 生长的最低温度为 20℃和最高温度为 30℃，*B. galactosidilyticus* 生长的最低温度为 30℃和最高温度为 40℃，*B. indicus* 生长的最低温度为 20℃和最高温度为 30℃，*B. soli* 生长的最低温度为 30℃和最高温度为 40℃。

对芽胞杆菌的温度范围，利用欧氏距离，以类平均法进行系统聚类，分析结果见图 1-50。当 λ=23 时，被测芽胞杆菌可以分为 3 类。

第 1 类为低温型芽胞杆菌，包括了 5 种芽胞杆菌，即 *B. globisporus*、*B. fordii*、*B. murimartini*、*B. psychrosaccharolyticus*、*B. psychrotolerans*，特点是适应的最低温度较低，

为 0～10℃，适应的平均温度较低，为 15～17℃，适应的最高温度也较低，为 25～30℃。

第 2 类为高温型芽胞杆菌，包括了 10 种芽胞杆菌，即 *B. acidiproducens*、*B. bataviensis*、*B. circulans*、*B. drentensis*、*B. gelatini*、*B. ginsengihumi*、*B. nealsonii*、*B. novalis*、*B. okuhidensis*、*B. oleronius*，特点是适应的最低温度较高，为 30～40℃，适应的平均温度较高，为 30～46℃，适应的最高温度也较高，为 50～55℃。

第 3 类为常温型芽胞杆菌，包括了其余 72 种芽胞杆菌，特点是适应的温度范围较宽，一般为 15～45℃，适应的平均温度为 20～30℃。

3. pH 适应性

利用表 1-26 数据，对芽胞杆菌的 pH 范围进行分析，用欧氏距离，以类平均法进行系统聚类，分析结果见图 1-51。当 λ=18 时，被测芽胞杆菌可以分为 3 类。

第 1 类为酸性 pH 适应型，包含 *B. acidicola* 一个种，特点是 pH 适应范围偏酸性，为 3.5～7.0，平均 pH 适应范围为 5.0。

第 2 类为碱性 pH 适应型，包含 *B. lentimorbus*、*B. carboniphilus*、*B. ginsengihumi*、*B. globisporus*、*B. indicus*、*B. licheniformis*、*B. megatherium*、*B. mojavensis*、*V. pantothenticus*、*B. psychrosaccharolyticus*、*B. acidiproducens*、*B. altitudinis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. badius*、*B. cibi*、*B. decolorationis*、*B. endophyticus*、*B. luciferensis*、*B. niacini*、*B. oleronius*、*B. panaciterrae*、*B. psychrotolerans*、*B. seohaeanensis*、*B. soli*、*B. sonorensis*、*B. subtilis*、*B. vallismortis*、*B. macyae*、*B. acidiceler*、*B. butanolivorans*、*B. bataviensis*、*B. boroniphilus*、*B. circulans*、*B. clausii*、*B. decisifrondis*、*B. drentensis*、*B. flexus*、*B. fordii*、*B. fortis*、*B. gelatini*、*B. horikoshii*、*B. humi*、*B. koreensis*、*B. marisflavi*、*B. massiliensis*、*B. muralis*、*B. niabensis*、*B. novalis*、*B. pseudomycoides*、*B. pumilus*、*B. safensis*、*B. selenatarsenatis*、*B. shackletonii*、*B. simplex*、*B. siralis*、*B. kribbensis*、*B. aryabhattai*、*B. atrophaeus*、*B. cereus*、*B. coagulans*、*L. fusiformis*、*B. galactosidilyticus*、*B. isronensis*、*B. mycoides*、*B. nealsonii*、*L. odysseyi*、*B. okuhidensis*、*L. sphaericus*、*B. thuringiensis*、*B. alkalitelluris*、*B. beijingensis*、*B. lehensis*、*B. ruris* 等 73 个种，特点是 pH 适应范围中性，为 6.0～9.0，平均 pH 适应范围为 7.0。

第 3 类为碱性 pH 适应型，包含 *B. alacalphilus*、*B. agaradhaerens*、*B. cellulosilyticus*、*B. cohnii*、*B. murimartini*、*B. okhensis*、*B. patagoniensis*、*B. pseudalcaliphilus*、*B. selenitireducens*、*B. vedderi*、*B. vietnamensis*、*B. hemicellulosilyticus*、*B. fastidiosus* 等 13 个种，特点是 pH 适应范围偏碱性，为 7.0～10.0，平均 pH 适应范围为 8.0。

4. 耐盐适应性

利用表 1-26 数据，对芽胞杆菌的耐盐范围进行分析，用欧氏距离，以类平均法进行系统聚类，分析结果见图 1-52。当 λ=18 时，被测芽胞杆菌可以分为 3 类。

第 1 类中等耐盐性，耐盐浓度的高限为 8%～10%，包括了 21 种芽胞杆菌，即 *B. agaradhaerens*、*B. clausii*、*B. decolorationis*、*B. endophyticus*、*B. flexus*、*B. ginsengihumi*、*B. mojavensis*、*B. okhensis*、*B. okuhidensis*、*V. pantothenticus*、*B. pseudalcaliphilus*、

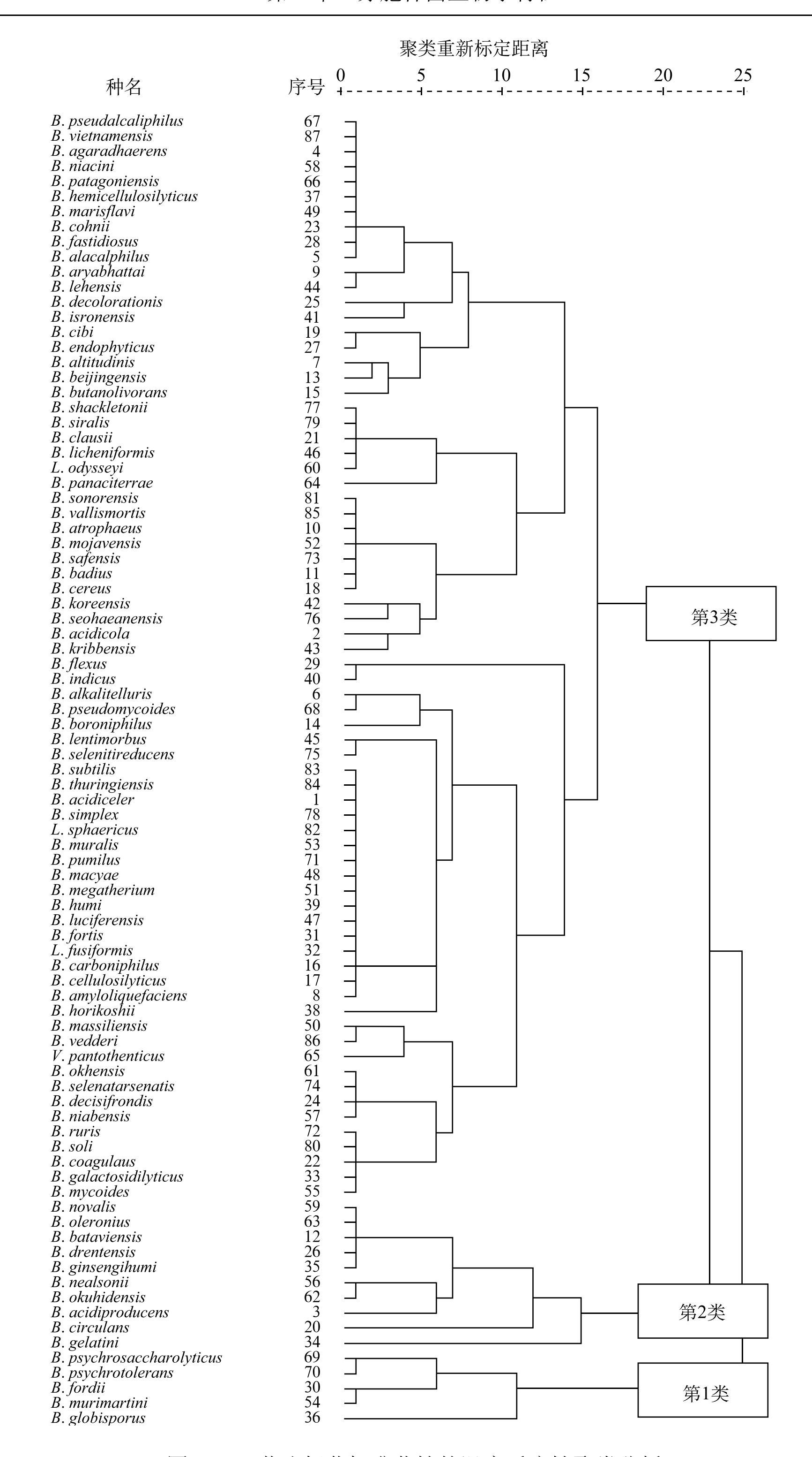


图 1-50　芽胞杆菌标准菌株的温度适应性聚类分析

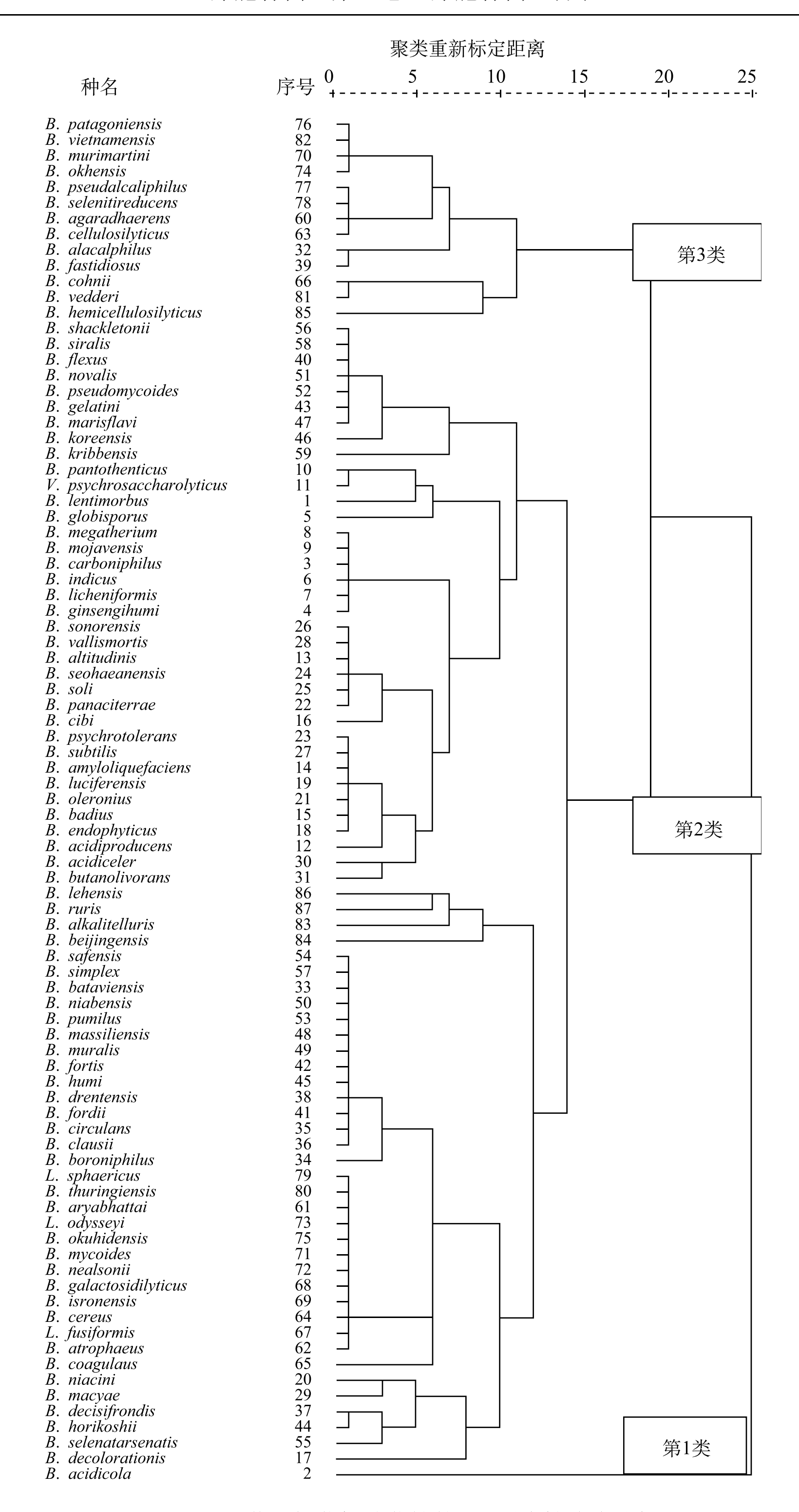


图 1-51　芽胞杆菌标准菌株的 pH 适应性聚类分析

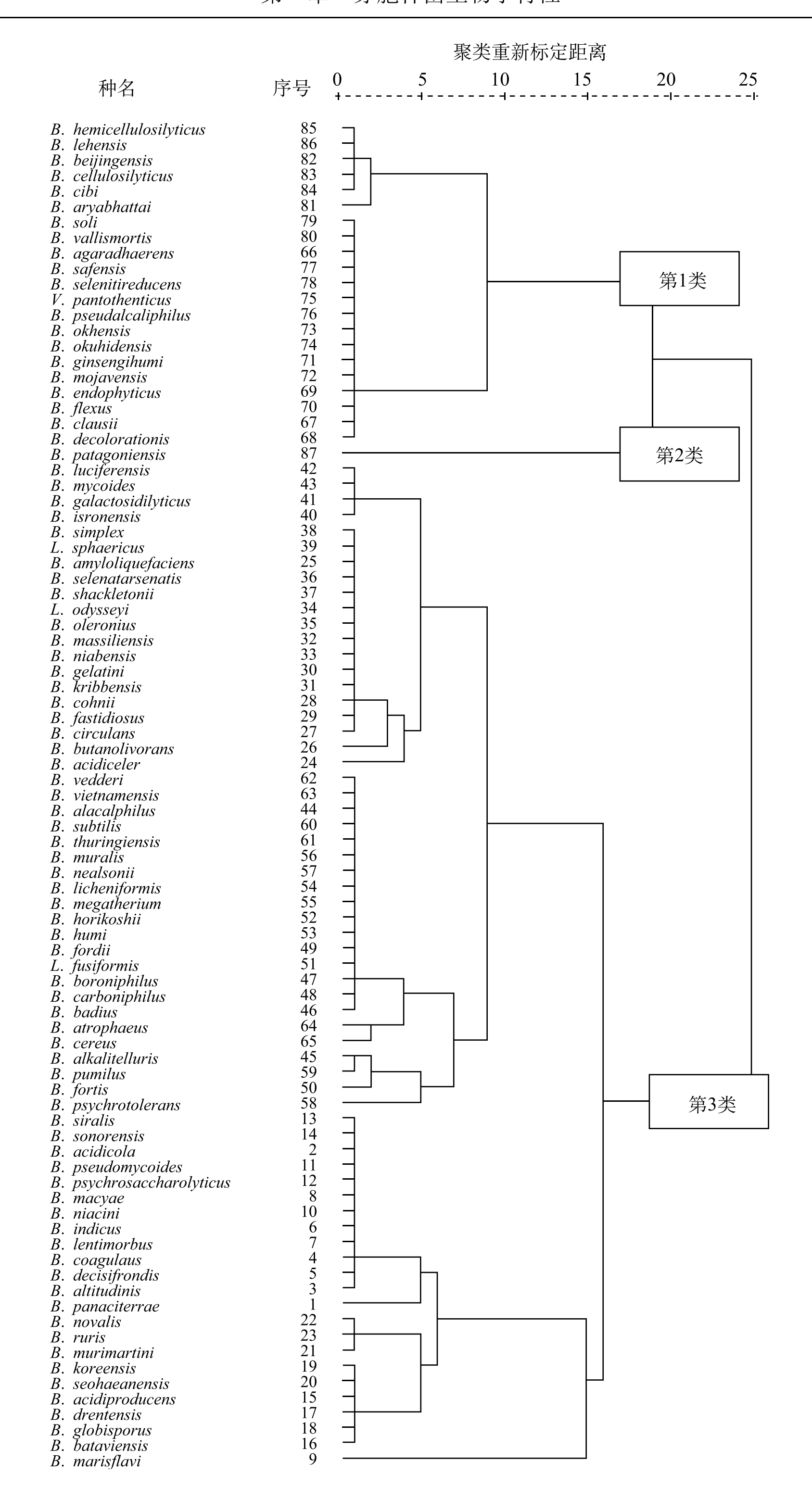


图 1-52　芽胞杆菌标准菌株的耐盐适应性聚类分析

B. safensis、*B. selenitireducens*、*B. soli*、*B. vallismortis*、*B. aryabhattai*、*B. beijingensis*、*B. cellulosilyticus*、*B. cibi*、*B. hemicellulosilyticus*、*B. lehensis*。

第 2 类高耐盐性，耐盐浓度的高限为 15%以上，包括了一种芽胞杆菌，即 *B. patagoniensis*。

第3类低耐盐性，耐盐浓度的高限为5%～8%，包括了65种芽胞杆菌，即*B. acidiceler*、*B. acidicola*、*B. acidiproducens*、*B. alkalitelluris*、*B. altitudinis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. badius*、 *B. boroniphilus*、*B. butanolivorans*、*B. carboniphilus*、*B. cereus*、*B. circulans*、*B. coagulans*、*B. cohnii*、*B. decisifrondis*、*B. drentensis*、*B. fastidiosus*、*B. fordii*、*B. fortis*、*L. fusiformis*、*B. galactosidilyticus*、*B. gelatini*、*B. globisporus*、*B. horikoshii*、*B. humi*、*B. indicus*、*B. koreensis*、*B. kribbensis*、*B. lentimorbus*、*B. licheniformis*、*B. luciferensis*、*B. macyae*、*B. marisflavi*、*B. massiliensis*、*B. megatherium*、*B. muralis*、*B. murimartini*、*B. mycoides*、*B. nealsonii*、*B. niacini*、*B. novalis*、*L. odysseyi*、*B. panaciterrae*、*B. simplex*、*L. sphaericus*、*B. selenatarsenatis*、*B. shackletonii*、*B. oleronius*、*B. niabensis*、*B. vedderi*、*B. vietnamensis*、*B. alacalpilus*、*B. subtilis*、*B. thuringiensis*、*B. atrophaeus*、*B. pumilus*、*B. psychrotolerans*、*B. siralis*、*B. sonorensis*、*B. pseudomycoides*、*B. psychrosaccharolyticus*、*B. ruris*、*B. seohaeanensis*、*B. bataviensis*、*B. isronensis*。

四、讨论

绝大多数芽胞杆菌是一个菌体仅形成一个芽胞位于菌体内，为革兰氏阳性菌。内含DNA、RNA、可能与 DNA 相联系的特异芽胞蛋白质及合成蛋白质和产生能量的系统。此外，还有大量的吡啶二羧酸钙布满整个芽胞。皮层处于核心和芽胞壳之间，含有丰富的肽聚糖。芽胞壳主要由蛋白质组成，此外，还有少量的碳水化合物和类脂类化合物，可能还有大量的磷。最外层是外壁，其主要成分是蛋白质、一定量的葡萄糖和类脂。由于芽胞具有厚而含水量低的多层结构，因此折光性强、对染料不易着色，芽胞对热、干燥、辐射、化学消毒剂和其他理化因素有较强的抵抗力，这可能与芽胞独具的高含量吡啶二羧酸有关。芽胞杆菌可以应用于：①有机肥、农家肥、复合肥、化肥添加；②生物农药添加；③激活土壤；④堆肥、液肥制作；⑤粗纤维降解；⑥厨余处理；⑦饲料添加；⑧环境净化；⑨水产水质净化。

芽胞杆菌生长特点表现为：繁殖快、代谢快，4h 增殖 10 万倍；生命力强，无湿状态可耐低温−60℃、耐高温 280℃，耐强酸、耐强碱、抗菌消毒、耐高氧（嗜氧繁殖）、耐低氧（厌氧繁殖）；体积大，体积比一般病原菌分子大 4 倍，占据空间优势，抑制有害菌的生长繁殖。芽胞杆菌的功能包括①保湿性强，形成强度极为优良的天然材料聚麸胺酸，为土壤的保护膜，防止肥分及水分流失；②有机质分解力强，增殖的同时，会释放高活性的分解酵素，将难分解的大分子物质分解成可利用的小分子物质；③产生丰富的代谢生成物，合成多种有机酸、酶、生理活性等物质，以及其他多种容易被利用的养分；④抑菌、灭害力强，抑制有害菌、病原菌等有害微生物的生长繁殖；⑤除臭，可以分解产生恶臭气体的有机物质、有机硫化物、有机氮等，大大改善场所的环境。芽胞杆菌能提高动物生产性能是其产生多种消化酶的一个重要体现。研究表明，芽胞杆菌能产

生多种消化酶，帮助动物对营养物质的消化吸收。芽胞杆菌具有较强的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性，同时还具有降解饲料中复杂碳水化合物的酶，如果胶酶、葡聚糖酶、纤维素酶等，这些酶能够破坏植物饲料细胞的细胞壁，促使细胞的营养物质释放出来，并能消除饲料中的抗营养因子，减少抗营养因子对动物消化利用的障碍。

第五节　芽胞杆菌生理生化测定方法

一、概述

1. 芽胞杆菌糖类分解

芽胞杆菌分泌胞外酶，将菌体外的多糖分解成单糖（葡萄糖）后再吸收。各种芽胞杆菌将多糖分解为单糖，进而转化为丙酮酸，这一过程是一致的。对于丙酮酸的利用，需氧菌和厌氧菌则不相同。需氧菌将丙酮酸经三羧酸循环彻底分解成 CO_2 和水。厌氧菌则发酵丙酮酸，产生各种酸类（如甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、琥珀酸等）、醛类（如乙醛）、醇类（如乙醇、乙酸甲基甲醇、异丙醇、丁醇等）、酮类（如丙酮）。不同芽胞杆菌具有不同的酶，对糖类的分解能力和代谢产物也不同，借此可以鉴别芽胞杆菌。

2. 芽胞杆菌蛋白质分解

蛋白质分子在芽胞杆菌分泌的蛋白质水解酶的作用下，在肽键处断裂，生成多肽和二肽。多肽和二肽在肽酶的作用下水解，生成各种氨基酸。二肽和氨基酸可被芽胞杆菌吸收，氨基酸在体内脱氨基酶的作用下，经脱氨基作用生成氨。不同种芽胞杆菌在不同的条件下所进行的脱氨基作用的方式（氧化脱氨基、水解脱氨基、还原脱氨基）及代谢产物也不同，可借此鉴别芽胞杆菌。例如，有些芽胞杆菌能使色氨酸氧化脱氨基，生成吲哚、CO_2 和 H_2O。芽胞杆菌还可以用脱羧酶使氨基酸脱羧，生成胺类（如组胺）和 CO_2。

3. 芽胞杆菌其他物质分解

芽胞杆菌除能分解糖和蛋白质外，对一些有机物和无机物也可分解利用。各种芽胞杆菌产生的酶不同，其代谢的基质不同，代谢的产物也不一样，故可用于鉴别芽胞杆菌。

各种芽胞杆菌具有各自独特的酶系统，因而对底物的分解能力不同，其代谢产物也不同。用生物化学方法测定这些代谢产物，可用来区别和鉴定芽胞杆菌的种类。利用生物化学方法来鉴别不同芽胞杆菌，称为芽胞杆菌的生物化学试验或称为生化反应。生物化学试验的方法很多，主要有以下几类。

二、碳水化合物的代谢试验

（1）糖（醇、苷）类发酵试验

原理：不同种类芽胞杆菌含有发酵不同糖（醇、苷）类的酶，因而对各种糖（醇、苷）类的代谢能力也有所不同，即使能分解某种糖（醇、苷）类，其代谢产物可因菌种

而异。检查芽胞杆菌对培养基中所含糖（醇、苷）类降解后产酸或产酸产气的能力，可用以鉴定芽胞杆菌种类。方法：在基础培养基中（如酚红肉汤基础培养基 pH7.4）加入 0.5%～1.0%（*w*/*V*）特定的糖（醇、苷）类。所使用的糖（醇、苷）类有很多种，根据不同需要可选择单糖、多糖或低聚糖、多元醇和环醇等。将待鉴定的纯培养芽胞杆菌接种到试验培养基中，置 35℃孵育箱内孵育数小时到两周（视方法及菌种而定）后，观察结果。若用微量发酵管，或要求培养时间较长时，应注意保持其周围的湿度，以免培养基干燥。结果：能分解糖（醇、苷）类产酸的芽胞杆菌，培养基中的指示剂呈酸性反应（如酚红变为黄色），产气的芽胞杆菌可在小导管（Durham 小管）中产生气泡，固体培养基则产生裂隙。不分解糖则无变化。应用：糖（醇、苷）类发酵试验，是鉴定芽胞杆菌的生化反应试验中最主要的试验，不同芽胞杆菌可发酵不同的糖（醇、苷）类，如沙门氏菌可发酵葡萄糖，但不能发酵乳糖，大肠杆菌则可发酵葡萄糖和乳糖。即便是两种芽胞杆菌均可发酵同一种糖类，其发酵结果也不尽相同，如志贺菌和大肠杆菌均可发酵葡萄糖，但前者仅产酸，而后者则产酸、产气，故可利用此试验鉴别芽胞杆菌。

（2）葡萄糖代谢类型鉴别试验

原理：芽胞杆菌在分解葡萄糖的过程中，必须有分子氧参加的，称为氧化型；能进行无氧降解的为发酵型；不分解葡萄糖的芽胞杆菌为产碱型。发酵型芽胞杆菌无论在有氧或无氧环境中都能分解葡萄糖，而氧化型芽胞杆菌在无氧环境中则不能分解葡萄糖。本试验又称氧化发酵（O/F 或 Hugh-Leifson，HL）试验，可用于区别芽胞杆菌的代谢类型。方法：挑取少许纯培养物（不要从选择性平板中挑取）接种到 2 支 HL 培养管中，在其中一管加入高度至少为 0.5cm 的无菌液体石蜡以隔绝空气（作为密封管），另一管不加（作为开放管）。置 35℃孵育箱孵育 48h 以上。结果：两管培养基均不产酸（颜色不变）为阴性；两管都产酸（变黄）为发酵型；加液体石蜡管不产酸，不加液体石蜡管产酸为氧化型。应用：主要用于肠杆菌科与其他非发酵菌的鉴别。肠杆菌科、弧菌科、芽胞杆菌为发酵型，非发酵菌为氧化型或产碱型。也可用于鉴别葡萄球菌（发酵型）与微球菌（氧化型）。

（3）甲基红（MR）试验

原理：某些芽胞杆菌在糖代谢过程中，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸进一步被分解为甲酸、乙酸和琥珀酸等，使培养基 pH 下降至 4.5 以下时，加入甲基红（MR）指示剂呈红色。如果芽胞杆菌分解葡萄糖产酸量少，或产生的酸进一步转化为其他物质（如醇、醛、酮、气体和水），培养基 pH 在 5.4 以上，加入甲基红指示剂呈橘黄色。方法：将待检菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水中，35℃孵育 48～96h 后，于 5ml 培养基中滴加 5～6 滴甲基红指示剂，立即观察结果。结果判定：呈现红色者为阳性，橘黄色为阴性，橘红色为弱阳性。应用：常用于肠杆菌科内某些种属的鉴别，如大肠杆菌和产气肠杆菌，前者为阳性，后者为阴性。肠杆菌属和哈夫尼亚菌属为阴性，而沙门氏菌属、志贺菌属、枸橼酸杆菌属和变形杆菌属等为阳性。

（4）β-半乳糖苷酶试验

原理：乳糖发酵过程中需要乳糖通透酶和 β-半乳糖苷酶才能快速分解。有些芽胞杆菌只有半乳糖苷酶，因而只能迟缓发酵乳糖，所有乳糖快速发酵和迟缓发酵的芽胞杆菌

均可快速水解邻硝基酚-β-D-半乳糖苷（*O*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside，ONPG）而生成黄色的邻硝基酚。用于枸橼酸菌属、亚利桑那菌属与沙门氏菌属的鉴别。方法：将待检菌接种于 ONPG 肉汤中，35℃水浴或孵育箱孵育 18～24h，观察结果。结果：呈现亮黄色为阳性，无色为阴性。应用：可用于迟缓发酵乳糖芽胞杆菌的快速鉴定，本法对于迅速及迟缓分解乳糖的芽胞杆菌均可短时间内呈现阳性。埃希菌属、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属、哈夫尼亚菌属、沙雷菌属和肠杆菌属等均为试验阳性，而沙门氏菌属、变形杆菌属和普罗威登斯菌属等为阴性。

（5）伏普二氏（VP）试验

原理：测定芽胞杆菌产乙酰甲基甲醇的能力。某些芽胞杆菌如产气肠杆菌，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸进一步脱羧形成乙酰甲基甲醇。在碱性条件下，乙酰甲基甲醇被氧化成二乙酰，进而与培养基中的精氨酸等含胍基的物质结合形成红色化合物，即 VP 试验阳性。方法：将待检菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水中，35℃孵育 24～48h，加入 50g/L α-萘酚（95%乙醇溶液）0.6ml，轻轻振摇试管，然后加入 0.2ml 400g/L KOH，轻轻振摇试管 30s 至 1min，然后静置观察结果。结果：红色者为阳性，黄色或类似铜色为阴性。应用：主要用于大肠杆菌和产气肠杆菌的鉴别。本试验常与 MR 试验一起使用，一般情况下，前者为阳性的芽胞杆菌，后者常为阴性，反之亦然。但肠杆菌科芽胞杆菌不一定都是这样的规律，如蜂房哈夫尼亚菌和奇异变形杆菌的 VP 试验和 MR 试验常同为阳性。

（6）胆汁七叶苷水解试验

原理：在 10%～40%胆汁存在下，测定芽胞杆菌水解七叶苷的能力。七叶苷被芽胞杆菌分解生成七叶素，七叶素与培养基中的枸橼酸铁的二价铁离子发生反应形成黑色化合物。方法：将被检菌接种于胆汁七叶苷培养基中，35℃孵育 18～24h 后，观察结果。结果：培养基完全变黑为阳性，不变黑为阴性。应用：主要用于鉴别 D 群链球菌与其他链球菌的区别，以及肠杆菌科的某些种、某些厌氧菌（如脆弱拟杆菌等）的初步鉴别。本试验 D 群链球菌为阳性。

（7）淀粉水解试验

原理：产生淀粉酶的芽胞杆菌能将淀粉水解为糖类，在培养基上滴加碘液时，可在菌落周围出现透明区。方法：将待检菌划线接种于淀粉琼脂平板或试管中，35℃孵育 18～24h，加入革兰碘液数滴，立即观察结果。结果：阳性反应，菌落周围有无色透明区，其他地方蓝色；阴性反应，培养基全部为蓝色。应用：用于白喉棒状杆菌生物型的分型，重型淀粉水解试验阳性，轻、中型阴性；芽胞杆菌属菌种和厌氧菌某些种的鉴定。

（8）甘油复红试验

原理：甘油可被芽胞杆菌分解生成丙酮酸，丙酮酸脱去羧基为乙醛，乙醛与无色的复红生成醌式化合物，呈深紫红色。方法：取待检菌接种于甘油复红肉汤培养基中，于 35℃孵育，观察 2～8d。应同时进行阴性对照。结果：紫红色为阳性，与对照管颜色相同为阴性。应用：主要用于沙门氏菌属内各菌种间的鉴别。伤寒沙门氏菌、甲（丙）型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、孔道夫沙门氏菌和仙台沙门氏菌在本试验中为阴性，乙型副伤寒沙门氏菌结果不定，其他不常见沙门氏菌多数为阳性。

（9）葡萄糖酸氧化试验

原理：某些芽胞杆菌可氧化葡萄糖酸钾，生成 α-酮基葡萄糖酸。α-酮基葡萄糖酸是一种还原性物质，可与班氏试剂起反应，出现棕色或砖红色的氧化亚铜沉淀。方法：将待检菌接种于葡萄糖酸盐培养基中（1ml），置 35℃孵育 48h，加入班氏试剂 1ml，于水浴中煮沸 10min 并迅速冷却，观察结果。结果：出现黄到砖红色沉淀为阳性，不变或仍为蓝色为阴性。应用：主要用于假单胞菌的鉴定和肠杆菌科菌分群。

三、氨基酸和蛋白质的代谢试验

（1）硫化氢试验

原理：某些芽胞杆菌能分解含硫氨基酸生成硫化氢，与亚铁离子或铅离子结合形成黑色沉淀物。方法：将待检菌接种于含硫化物及亚铁离子的培养基或克氏双糖铁琼脂（KIA）中，35℃孵育 18～24h，观察有无黑色沉淀出现。或用乙酸铅纸条，悬挂于 KIA 管中（白色滤纸，根据试管大小裁剪适当，在热的 50g/L 乙酸铅饱和水溶液中浸泡，然后于 50～60℃烘干，121℃、15min 高压灭菌备用）。结果：有黑色沉淀物为阳性。应用：主要用于鉴别肠杆菌科芽胞杆菌，如沙门氏菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属、爱德华菌属等为阳性，其他菌属大多为阴性。但沙门氏菌属中也有部分硫化氢阴性菌株，如甲型副伤寒菌、仙台菌、猪霍乱沙门氏菌等。

（2）明胶液化试验

原理：芽胞杆菌分泌的胞外蛋白水解酶（明胶酶）能分解明胶，使明胶失去凝固能力而液化。方法：将待检菌接种于明胶培养基中，35℃孵育 24h 到 7d 或更长时间，每 24h 取出放入 4℃冰箱约 2h 后，观察有无凝固。结果：如无凝固，则表示明胶已被水解，液化试验阳性。如凝固，则继续培养。应用：奇异变形杆菌、普通变形杆菌、沙雷菌属和阴沟肠杆菌等都能液化明胶，肠杆菌科中的其他芽胞杆菌很少液化明胶。有些厌氧菌如产气荚膜梭菌、脆弱类杆菌（*Bacterooides fragilis*，Bf）等也能液化明胶。另外，许多假单胞菌也能产生明胶酶而使明胶液化。

（3）吲哚试验（靛基质试验）

原理：某些芽胞杆菌有色氨酸酶，能分解色氨酸产生吲哚，吲哚与对二甲氨基苯甲醛形成红色的玫瑰吲哚。方法：将待检菌接种于富含色氨酸的蛋白胨水培养基中，35℃孵育 24～48h，加入靛基质试剂，观察结果。结果：红色为阳性，无色为阴性。应用：主要用于肠杆菌科芽胞杆菌的鉴定，如大肠杆菌与产气肠杆菌、肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌等的鉴别。

（4）苯丙氨酸脱氨酶试验

原理：测定芽胞杆菌是否产生苯丙氨酸脱氨酶。芽胞杆菌产生的苯丙氨酸脱氨酶使苯丙氨酸脱氨后生成苯丙酮酸，加入三氯化铁试剂后产生绿色反应。若延长时间，会引起褪色。方法：将待检菌大量接种到苯丙氨酸培养基中，35℃孵育 18～24h，滴加 100g/L 三氯化铁试剂 4～5 滴，立即观察菌落生长处有无绿色出现。结果：有绿色出现为阳性。应用：变形杆菌属、普罗威登菌属、摩根菌属均为阳性，肠杆菌科其他芽胞杆菌均为阴性。

（5）氨基酸脱羧酶试验

原理：某些芽胞杆菌可产生氨基酸脱羧酶使氨基酸脱羧生成胺和二氧化碳。由于胺的生成使培养基变为碱性，可用指示剂指示出来。方法：将待检菌分别接种于一支氨基酸（赖氨酸、鸟氨酸或精氨酸）脱羧酶试验管和一支氨基酸脱羧酶对照管（无氨基酸），各覆盖至少 0.5cm 高度的无菌液体石蜡，35℃孵育 1～4d，观察结果。结果：若为溴甲酚紫指示剂，则试验管紫色为阳性，黄色为阴性，对照管应为黄色。应用：主要用于某些芽胞杆菌种间的鉴别，如赖氨酸用于产气肠杆菌（阳性）与阴沟肠杆菌（阴性）；鸟氨酸用于阴沟肠杆菌（阳性）和克雷伯菌（阴性）；精氨酸用于阴沟肠杆菌（阳性）和产气肠杆菌（阴性）等。

（6）精氨酸双水解酶试验

原理：精氨酸经两次水解后，生成鸟氨酸、氨及二氧化碳。鸟氨酸又在脱羧酶的作用下生成腐胺。氨及腐胺均为碱性物质，故可使培养基变碱，用指示剂指示出来。方法：将待检菌接种于试验培养基上，置 35℃孵育箱孵育 1～4d，观察结果。结果：溴甲酚紫指示剂呈紫色为阳性，酚红指示剂呈红色为阳性。黄色为阴性。应用：主要用于肠杆菌科及假单胞菌属的鉴定。

（7）尿素酶试验

原理：某些芽胞杆菌能产生尿素酶，分解尿素产生大量的氨，使培养基变碱。方法：将待检菌接种于含有尿素的培养基中，35℃孵育 18～24h，观察结果。结果：红色为阳性，不变为阴性。应用：主要用于肠杆菌科变形杆菌属、普罗威登菌属、克雷伯菌属及假单胞菌属的鉴定。

（8）霍乱红试验

原理：霍乱弧菌分解色氨酸生成吲哚，并能使硝酸盐还原为亚硝酸盐，当加入硫酸后生成亚硝酸吲哚，呈红色反应。方法：将待检菌接种于蛋白胨水中，置 35℃孵育 24h，加入浓硫酸数滴，观察结果。结果：呈红色者为阳性。应用：霍乱弧菌呈阳性反应，但本试验并非霍乱弧菌所特有。凡能产生吲哚并还原硝酸盐为亚硝酸盐的芽胞杆菌，均可呈现阳性反应。

四、碳源和氮源利用试验

（1）枸橼酸盐利用试验

原理：某些芽胞杆菌能利用枸橼酸盐作为唯一碳源，而在此培养基上生长，并分解枸橼酸盐生成碳酸钠，使培养基变碱性。方法：将待检菌接种于枸橼酸盐培养基上，置 35℃孵育 1～4d，逐日观察结果。结果：若用溴麝香草酚蓝指示剂，斜面出现菌落或菌苔，培养基变蓝色为阳性；无菌落生长，培养基绿色为阴性。应用：可用此试验作为芽胞杆菌种属间鉴定。埃希菌属、志贺菌属、爱德华菌属和耶尔森菌属均为阴性，沙门氏菌属、克雷伯菌属通常为阳性，黏质和液化沙雷菌、某些变形杆菌及枸橼酸杆菌为阳性。此外，铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌和嗜水气单胞菌也能利用枸橼酸盐。

（2）丙二酸盐利用试验

原理：某些芽胞杆菌能利用丙二酸盐作为唯一碳源，丙二酸盐被分解生成碳酸钠，

使培养基变碱。方法：将待检菌接种于丙二酸盐培养基中，置 35℃孵育 24～48h，观察结果。结果：培养基由绿色变为蓝色为阳性。颜色无变化为阴性。应用：肠杆菌科中亚利桑那菌和克雷伯菌属为阳性，枸橼酸杆菌属、肠杆菌属和哈夫尼亚菌属有不同生物型反应，其他各菌属均为阴性。

（3）乙酸钠利用试验

原理：芽胞杆菌利用铵盐作为唯一氮源，同时，利用乙酸盐作为唯一碳源时，可在乙酸盐培养基上生长，分解乙酸盐生成碳酸钠，使培养基变为碱性。方法：将被检菌接种于乙酸盐培养基中，置 35℃孵育 2～7d，逐日观察结果。结果：培养基上有芽胞杆菌生长，并变为蓝色则为阳性。应用：主要用于大肠杆菌和志贺菌属的鉴别，前者为阳性，而后者为阴性。

（4）马尿酸钠水解试验

原理：某些芽胞杆菌具有马尿酸水解酶，可使马尿酸水解为苯甲酸和甘氨酸，苯甲酸与三氯化铁试剂结合，形成苯甲酸铁沉淀。方法：将待检菌接种于马尿酸钠培养基中，置 35℃孵育 48h，离心沉淀，取上清液 0.8ml，加入三氯化铁试剂 0.2ml，立即混匀，经 10～15min 观察结果。结果：出现恒定的沉淀物为阳性。应用：主要用于 B 群链球菌的鉴定。

（5）乙酰胺利用试验

原理：许多非发酵菌产生一种脱酰胺酶，可使乙酰胺经脱酰胺作用释放氨，使培养基变碱。方法：将待检菌接种于乙酰胺培养基中，置 35℃孵育 24～48h，观察结果。结果：培养基由绿色变为蓝色为阳性。如不生长，或稍有生长，但培养基颜色不变为阴性。应用：主要用于非发酵菌的鉴定。铜绿假单胞菌、去硝化产碱杆菌、食酸假单胞菌为阳性，其他非发酵菌大多数为阴性。

（6）物质利用

主要进行柠檬酸盐利用、三糖铁利用、氰化钾利用、硫化氢试验、吲哚反应、V-P 反应和硝酸还原反应检测。①柠檬酸盐利用。培养基为 NaCl 1g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、$(NH_4)_2H_2PO_4$ 0.5g、柠檬酸钠 2g、0.04%酚红液 20ml、蒸馏水 1000ml，pH 7.0 分装试管，121℃高压灭菌 15min。斜面上划线接种，适温培养 3～7d，培养基为碱性（指示剂蓝色或桃红色）者为阳性，否则为阴性。②硫化氢试验。培养基为牛肉膏 7.5g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、琼脂 15g、10% $FeCl_2$、蒸馏水 1000ml，pH7.0～7.2，分装试管，121℃灭菌 15min。③V-P 反应培养基为蛋白胨 5g、葡萄糖 5g、NaCl 5g、水 1000ml，pH 7.0～7.2，121℃灭菌 20min。试剂为肌酸 0.3%或原粉，NaOH 40%。接种试验菌于上述培养液中，每次 3 个重复，置适温培养 2d、6d 观察结果。取培养液和 40%氢氧化钠等量相混。加少许肌酸，10min 如培养液出现红色，即为阳性反应，有时需要放置更长时间才出现红色反应。④吲哚反应培养基为 1%胰蛋白胨水溶液，pH7.2～7.6，分装试管，121℃灭菌 20min。试剂为对二甲基氨基苯甲醛 8g，乙醇 760ml，浓 HCl 160ml。把新鲜的菌种接种于上述培养基中，适温培养。培养 1d、2d、4d、7d 后观察，沿管壁缓缓加入 3～5mm 高的试剂于培养液表面，在液层界面发生红色，即为阳性反应。若颜色不明显，可加入 4～5 滴乙醚至培养液，摇动，使乙醚分散于液体中，将培养液静置片刻，待乙醚浮于液面

后再加吲哚试剂。⑤硝酸还原反应。培养基为肉汁胨培养基，牛肉浸膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、蒸馏水 1000ml、KNO_3 1g，pH7.0～7.6，121℃蒸汽灭菌 15min。A 液：对氨基苯磺酸 0.5g，稀乙酸（10%）150ml。B 液：α-萘胺 0.1g，蒸馏水 20ml，稀乙酸（10%）150ml。二苯胺试剂：二苯胺 0.5g 溶于 100ml 浓硫酸中，用 20ml 蒸馏水稀释。将测定菌接种于硝酸盐液体培养基中，置适温培养 1d、3d、5d，每株菌作两个重复，另留两管不接种作对照。取两支干净的空试管或在比色瓷盘小窝中倒入少许培养 1d、3d、5d 的培养液，再各加一滴 A 液和 B 液，在对照管中加入同样 A 液及 B 液一滴；当培养液中滴入 A、B 液后，溶液如变粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性。如无红色出现，则可加一两滴二苯胺试剂，此时如呈蓝色反应，则表示培养液中仍有硝酸盐，又无亚硝酸盐反应，表示无硝酸盐还原作用；如不呈蓝色反应，表示硝酸盐和形成的亚硝酸盐都已还原成其他物质，故仍按硝酸盐还原阳性处理。

（7）产酸作用

主要进行 D-乳糖（D-lactose）、D-葡萄糖（D-glucose）、D-果糖（D-fructose）、D-蔗糖（D-saccharose）、D-松二糖（D-turanose）、D-阿拉伯糖（D-arabinose）、L-阿拉伯糖（L-arabinose）、D-核糖（D-ribose）、D-木糖（D-xylose）、L-木糖（L-xylose）、D-半乳糖（D-galactose）、D-甘露糖（D-mannose）、L-山梨糖（L-sorbose）、L-鼠李糖（L-rhamnose）、D-纤维素糖（D-cellobiose）、D-麦芽糖（D-maltose）、D-蜜二糖（D-melibiose）、D-海藻糖（D-trehalose）、D-松三糖（D-melezitose）、D-棉子糖（D-raffinose）、糖原（glycogen）、龙胆二糖（gentiobiose）、D-塔格糖（D-tagatose）、D-岩藻糖（D-fucose）、L-岩藻糖（L-fucose）、赤藓糖醇（erythritol）、甘油（glycerol）、半乳糖醇（dulcitol）、肌醇（inositol）、木糖醇（xylitol）、D-甘露醇（D-mannitol）、D-山梨醇（D-sorbitol）、D-阿拉伯醇（D-arabitol）、L-阿拉伯醇（L- arabitol）、葡萄糖酸盐（potassium gluconate）、苦杏仁苷（amygdaline）、熊果苷（arbutin）、菊粉（inulin）、水杨苷（salicine）、*N*-乙酰葡糖胺（*N*-acetylglucosamine）、甲基-β-D-吡喃木糖苷（Methyl-β-D-xylopyranoside）、甲基-α-D-吡喃甘露糖苷（Methyl-α-D-mannopyranoside）、甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷（Methyl-α-D- glucopyranoside）、2-酮基-D-葡萄糖酸（potassium 2-ketogluconate）和 5-酮基-D-葡萄糖酸（potassium 5-ketogluconate）的检测，以蔗糖发酵和葡萄糖发酵为例进行描述。①蔗糖发酵（sugar fermentation）。培养基为$(NH_4)_2HPO_4$ 1.0g、KCl 0.2g、$MgSO_4$ 0.2g、酵母膏 0.2g、琼脂 5～6.0g、蔗糖 10.0g、蒸馏水 1000ml、溴甲酚紫（0.04%）15ml，pH7.0～7.2，分装试管，培养基高度 4～5cm，121℃灭菌 20min。以幼龄菌穿刺接种于上述培养基，适温培养，1d、3d、5d 后观察，如指示剂变黄，表示产酸，为阳性；不变或变蓝则为阴性。②葡萄糖氧化发酵（glucose oxidation fermentation）。培养基为蛋白胨 2g、NaCl 5g、K_2HPO_4 0.2g、葡萄糖 10.0g、琼脂 6.0g、溴百里酚蓝 1%水溶液 3ml、蒸馏水 1000ml，pH7.0～7.2，121℃蒸汽灭菌 20min。以 18～24h 幼龄菌种作为种子，穿刺接种，每株 4 支。其中两支用灭菌的凡士林液体石蜡（熔化的 2/3 凡士林中加入 1/3 液体石蜡，高压灭菌）封盖，厚 0.5～1cm，以隔绝空气，为闭管。另两支不封油为开管，同时还要有不接种的闭管和开管作对照。适温培养 1d、2d、7d 和 14d 观察结果。只有开管产酸变黄者为氧化型；开管和闭管均产酸变黄者为发酵型。

五、酶类试验

（1）氧化酶试验

原理：氧化酶又称细胞色素氧化酶，是细胞色素氧化酶系统中的最终呼吸酶。此酶并不直接与氧化酶试剂起反应，而是先使细胞色素 c 氧化，然后此氧化型细胞色素 c 再使对苯二胺氧化，产生颜色反应。因此，本试验结果与细胞色素 c 的存在有关。方法：取洁净滤纸条，蘸取菌落少许，加氧化酶试剂（10g/L 盐酸四甲基对苯二胺水溶液或 10g/L 盐酸二甲基对苯二胺水溶液）1 滴，1min 内观察结果。也可将试剂滴加到菌落上进行试验。结果：阳性者立即变为粉红色，5～10s 内呈深紫色。无色为阴性。应用：用于奈瑟菌属的菌种鉴定，该属芽胞杆菌均为阳性。此外，也用于假单胞菌属与肠杆菌科芽胞杆菌的区别，前者阳性，而后者阴性。莫拉菌属、产碱杆菌属等均为阳性。注意事项：①试验时应避免接触含铁物质，以免出现假阳性；②10g/L 盐酸四甲基对苯二胺或 10g/L 盐酸四甲基对苯二胺水溶液为无色溶液，在空气中易被氧化而失效，故应经常更换新试剂，并盛于棕色瓶中，若试剂已变成深蓝色，应弃去不用。

（2）触酶试验

原理：触酶又称过氧化氢酶，具有过氧化氢酶的芽胞杆菌，能催化过氧化氢成为水和原子态氧，继而形成氧分子，出现气泡。方法：取洁净玻片一张，用接种环挑取芽胞杆菌，加 3% H_2O_2 1 滴，立即观察结果。结果：若立即出现大量气泡为阳性，无气泡为阴性。应用：大多需氧和兼性厌氧菌均产生过氧化氢酶，但链球菌科为阴性，故常用此试验来鉴定。此外，金氏杆菌属的芽胞杆菌也为阴性。分枝杆菌的鉴别则用耐热触酶试验，结核分枝杆菌为阴性，戈氏分枝杆菌和地分枝杆菌为阳性。注意事项：①3% H_2O_2 溶液要新鲜配制；②不宜用血琼脂平板上生长的菌落，因红细胞含有触酶，可致假阳性反应；③取对数生长期的芽胞杆菌。

（3）凝固酶试验

原理：凝固酶试验是鉴定葡萄球菌致病性的重要试验。致病性葡萄球菌可产生两种凝固酶，一种是与细胞壁结合的凝聚因子，称为结合凝固酶，它直接作用于血浆中纤维蛋白原，使其发生沉淀，包围于芽胞杆菌外面而凝聚成块，玻片法阳性结果是由此凝聚因子所致；另一种凝固酶是分泌至菌体外，称为游离凝固酶，它能使凝血酶原变成凝血酶类产物，使纤维蛋白原变为纤维蛋白，从而使血浆凝固。试管法可同时测定结合型和游离型凝固酶。方法: ①玻片法，在一张洁净玻片中央加 1 滴生理盐水，用接种环取待检培养物与其混合（设阳性和阴性对照）制成菌悬液，若经 10～20s 内无自凝现象发生，则加入人或兔新鲜血浆一环，与菌悬液混合，观察结果；②试管法，于试管内加 1∶4 稀释的兔或人血浆 0.5ml，再加 1～2 个待试菌菌落，置 37℃水浴，每 30min 观察一次结果。结果：①玻片法，5～10s 内出现凝集者为阳性；②试管法，如有凝块或整管凝集出现为阳性。2h 后无上述现象出现，则放置过夜后再观察。应用：本试验仅用于致病性葡萄球菌的鉴定。注意事项：①玻片法为筛选试验，阳性、阴性均需进行试管法测定；②血浆必须新鲜；③应使用肝素而非枸橼酸盐作抗凝剂抗凝的血浆；④本试验也可用市购的胶乳凝集试验试剂盒测定。

（4）DNA 酶试验

原理：某些芽胞杆菌能产生 DNA 酶，水解外源性 DNA 使之成为寡核苷酸。DNA 可被酸沉淀，而寡核苷酸则不会。故在 DNA 琼脂平板上加盐酸后，可在菌落周围形成透明区。方法：在 DNA 琼脂平板上点种待检菌，35℃孵育 18～24h，用 1mol/L 盐酸倾注平板，观察结果。结果：如菌落周围有透明区者为阳性，无透明区为阴性。应用：主要用于肠杆菌科及葡萄球菌属某些菌种的鉴定。沙雷菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌 DNA 酶均为阳性。

（5）胆汁溶菌试验

原理：胆汁或去氧胆酸钠能导致某些芽胞杆菌溶解，一方面是胆汁或去氧胆酸钠降低了芽胞杆菌细胞膜上的表面张力，使芽胞杆菌的细胞膜破损或使菌体裂解。另一方面可能与激活芽胞杆菌体内的自溶酶有关。方法：①试管法，用纯培养物制备 1ml 生理盐水浓菌悬液，pH 调至 7.0，分装两支试管，各 0.5ml，其中一管加 0.5ml 100g/L 去氧胆酸钠为试验管，另一管加 0.5ml 生理盐水作对照。35℃孵育每小时观察一次结果。②平板法，在血平板上选取单个可疑菌落，做好标记，直接在菌落上加一接种环 20g/L 去氧胆酸钠（pH7.0），置 35℃孵育 30min（平板不要翻转）观察结果。结果：①试管法，在 3h 内液体透明为阳性；②平板法，如菌落消失，仅留下溶血区为阳性，菌落不消失为阴性。应用：用于肺炎链球菌的鉴定。

（6）硝酸盐还原试验

原理：硝酸盐还原反应包括两个过程，其一是在合成代谢过程中，硝酸盐还原为亚硝酸盐和氨，再由氨转化为氨基酸和细胞内其他含氮化合物；其二是在分解代谢过程中，硝酸盐或亚硝酸盐代替氧作为呼吸酶系统中的终末受氢体。硝酸盐还原过程可因芽胞杆菌不同而异。有的芽胞杆菌仅使硝酸盐还原为亚硝酸盐，如大肠杆菌等；有的芽胞杆菌可使其还原为亚硝酸盐和离子态的铵；有的芽胞杆菌能使硝酸盐或亚硝酸盐还原为氮，如沙雷菌属；有的芽胞杆菌还可以将其还原产物在合成性代谢中完全利用。硝酸盐或亚硝酸盐如果还原生成气体的终末产物如氮或氧化氮，则称为脱硝化或脱氮化作用。某些芽胞杆菌能还原硝酸盐为亚硝酸盐。

（7）卵磷脂酶试验

原理：细菌产生的卵磷脂酶，经钙离子作用，能迅速分解卵黄或血清中的卵磷脂形成混浊沉淀状的甘油酯和水溶性磷酸胆碱。方法：取待检菌划线接种或点种在卵黄琼脂平板上，置 35℃孵育 3～6h，观察结果。结果：3h 后在菌落周围形成乳白色混浊，即为卵磷脂酶试验阳性，6h 后该混浊圈可扩大到直径 5～6mm。应用：该试验主要用于厌氧的鉴定。产气荚膜梭菌和诺维梭菌为阳性，其他梭菌为阴性。蜡状芽胞杆菌也为阳性。

（8）磷酸酶试验

原理：磷酸酶是磷酸酯的水解酶，可使单磷脂水解，其反应可根据反应基质不同而异，如用磷酸酚酞为基质，经磷酸酶水解后可释放酚酞，在碱性环境中呈红色。方法：取待检菌接种于磷酸酚酞琼脂平板上，置 35℃孵育 18～24h，于平皿盖内加 1 滴浓氨水，熏蒸片刻，观察结果。也可用液体培养基，经孵育后，向管内加 400g/L 氢氧化钠溶液 1 滴，观察结果。结果：菌落变为红色者为阳性。应用：主要用于致病性葡萄球菌与非致

病性葡萄球菌的鉴别，前者为阳性，后者为阴性。

（9）脂酶试验

原理：细菌产生的脂酶可分解脂肪为游离脂肪酸。在培养基中加入维多利亚蓝可与脂肪结合成为无色化合物，如果脂肪被分解，则维多利亚蓝释出，呈蓝色。方法：将待检菌接种于含维多利亚蓝的脂酶培养基中，置35℃孵育24h，观察结果。结果：培养基变为深蓝色者为阳性，否则可呈无色或粉红色。应用：主要用于厌氧菌鉴定。在拟杆菌中，产黑色素拟杆菌中间亚种产生脂酶，其他拟杆菌为阴性；在梭菌属中诺维梭菌和产芽胞梭菌也产生此酶，其他梭菌为阴性。

（10）CAMP 试验

原理：B 群链球菌（无乳链球菌）产生一种“CAMP”因子，此种物质能促进葡萄球菌的β-溶血素的活性。因此，可在两种细菌的交界处溶血力增强，出现箭头型透明溶血区。方法：在羊血或马血琼脂平板上，先以β-溶血的金黄色葡萄球菌划一横线接种。再将待检菌与前一划线做垂直接种，两者应相距1cm，于35℃孵育18～24h，观察结果。每次试验应作阴阳性对照。结果：两种细菌划线交接处出现箭头型溶血区为阳性。应用：主要用于B群链球菌（阳性）的鉴定，其他链球菌均为阴性。

（11）其他酶类

主要进行脱氧核糖核酸酶（DNase）、精氨酸水解酶（arginine dihydrolase）、半乳糖苷酶[ONPG（β-Galactosidase）]、鸟氨酸脱羧酶（ornithine decarboxylase）、赖氨酸脱羧酶（lysine decarboxylase）、脲酶活性（urease activity）、氧化酶（oxidase）和接触酶（过氧化氢酶，catalase）的检测。①精氨酸双水解酶。培养基为蛋白胨1g、酚红0.01g、NaCl 5g、L-精氨酸盐10g、K_2HPO_4 0.3g、蒸馏水1000ml、琼脂6g，pH7.0～7.2，分装试管，121℃灭菌15min。用幼龄菌株种菌穿刺接种，并用灭菌液体石蜡封管，室温培养3d、7d、14d 观察。以不含精氨酸为空白对照，培养基转为红色者为阳性。②脲酶。培养基为蛋白胨10g、葡萄糖1g、NaCl 5g、KH_2PO_4 2g、酚红6ml、琼脂 20g、蒸馏水1000ml。接种后室温培养，分别于2h、4h 过夜观察。阴性结果要培养观察4d，培养基呈红色为阳性，颜色不变者为阴性。③氧化酶。在干净培养皿里放一张滤纸，滴上四甲基对苯二胺的1%溶液，刮取菌苔涂抹在滤纸上，菌苔10s 变为蓝色为阳性，10～60s 变蓝为延迟反应，60s 后为阴性反应。④接触酶。将24h 培养的菌种，以铂丝接种环取一小环涂抹于已滴有5%过氧化氢的玻片上，如有气泡产生为阳性，否则为阴性。

第六节　芽胞杆菌生理生化特性

一、概述

芽胞杆菌的生理生化特性是其生物学特性重要组成，同时，也作为芽胞杆菌种类鉴定的重要依据。同一种类的芽胞杆菌不同生境分布的菌株，其生理生化特性有较大的变化，为了了解这种变化，作者通过各地的样本采集分离，筛选出一批同种芽胞杆菌不同生境分布的菌株，对国内不同生境分离的9个芽胞杆菌种类的130个菌株12个生理生化

特性进行分析，研究其生理生化特性变化现象。不同的芽胞杆菌种类，其生理生化存在着差异，这种差异体现出芽胞杆菌的系统发育，可以为区别芽胞杆菌种类提供依据。为了系统研究芽胞杆菌种类的生理生化特性，作者收集了 87 种芽胞杆菌标准菌株进行生理生化特性分析，为芽胞杆菌研究者提供丰富的数据参照。

二、芽胞杆菌国内采集菌株的生理生化特性

对国内分离的 9 个芽胞杆菌 130 个菌株 12 个生理生化特性，包括丙二酸利用、柠檬酸盐利用、接触酶、氧化酶、蔗糖发酵、葡萄糖发酵、淀粉水解、MR、V-P、硝酸盐还原、吲哚、明胶液化等进行测定，测定结果见表 1-27。从表 1-27 中可以看出，同种芽胞杆菌不同样本来源的菌株，对生理生化反应存在异质性。例如，深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）47%菌株对丙二酸利用为阳性，33%菌株对柠檬酸盐利用为阳性，100%菌株对接触酶反应为阳性，75%菌株对氧化酶反应为阳性，93%菌株对蔗糖发酵为阳性，60%菌株对葡萄糖发酵为阳性，60%菌株对淀粉水解为阳性，27%菌株对 MR 反应为阳性，80%菌株对 V-P 反应为阳性，80%菌株对硝酸盐还原为阳性，0%菌株对吲哚反应为阳性，100%菌株对明胶液化反应为阳性。

表 1-27　国内分离鉴定的芽胞杆菌生理生化特性

	菌株编号	种名	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
1	FJAT-4399	*B. atrophaeus*	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
2	FJAT-4403	*B. atrophaeus*	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+
3	FJAT-4404	*B. atrophaeus*	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+
4	FJAT-4470	*B. atrophaeus*	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+
5	FJAT-4483	*B. atrophaeus*	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	+
6	FJAT-4495	*B. atrophaeus*	−	−	+	−	+	−	−	+−	+	−	−	+
7	FJAT-4520	*B. atrophaeus*	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+
8	FJAT-4580	*B. atrophaeus*	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+
9	FJAT-4582	*B. atrophaeus*	+	−	+	+	+−	+	−	−	+	+	−	+
10	FJAT-4589	*B. atrophaeus*	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	−	+
11	FJAT-4590	*B. atrophaeus*	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	−	+
12	FJAT-4620	*B. atrophaeus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+
13	FJAT-4643	*B. atrophaeus*	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+
14	FJAT-4750	*B. atrophaeus*	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+
15	FJAT-4751	*B. atrophaeus*	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+
16	FJAT-4382	*B. cereus*	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
17	FJAT-4386	*B. cereus*	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	+

续表

	菌株编号	种名	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
18	FJAT-4398	*B. cereus*	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	+
19	FJAT-4409	*B. cereus*	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
20	FJAT-4414	*B. cereus*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
21	FJAT-4418	*B. cereus*	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
22	FJAT-4419	*B. cereus*	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
23	FJAT-4476	*B. cereus*	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	+
24	FJAT-4478	*B. cereus*	−	−	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+
25	FJAT-4521	*B. cereus*	−	−	−	+	+	−	−	+	−	+	−	+
26	FJAT-4542	*B. cereus*	−	−	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+
27	FJAT-4556	*B. cereus*	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+
28	FJAT-4558	*B. cereus*	+	−	+	−	+−	−	+	+	+	+	−	+
29	FJAT-4577	*B. cereus*	+	−	+	+	+−	−	+	+	+	+	−	+
30	FJAT-4609	*B. cereus*	−	−	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+
31	FJAT-4610	*B. cereus*	−	−	+	+	−	+	+−	+	+	−	−	+
32	FJAT-4633	*B. cereus*	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+
33	FJAT-4634	*B. cereus*	−	+	+	+	+−	+	−	+	+	+	−	+
34	FJAT-4645	*B. cereus*	+−	−	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+
35	FJAT-4655	*B. cereus*	−	+	+	+	+−	+	+	−	−	+	−	+
36	FJAT-4656	*B. cereus*	+	−	+	−	+−	+	+	+−	−	−	−	+
37	FJAT-4415	*B. licheniformis*	+	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
38	FJAT-4431	*B. licheniformis*	−	−	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+
39	FJAT-4646	*B. licheniformis*	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	−	+
40	FJAT-4648	*B. licheniformis*	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+
41	FJAT-4394	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−
42	FJAT-4395	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−
43	FJAT-4396	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−
44	FJAT-4401	*B. megatherium*	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	+
45	FJAT-4406	*B. megatherium*	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
46	FJAT-4407	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
47	FJAT-4412	*B. megatherium*	+	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
48	FJAT-4416	*B. megatherium*	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+
49	FJAT-4417	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
50	FJAT-4420	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
51	FJAT-4421	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
52	FJAT-4422	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+

续表

	菌株编号	种名	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
53	FJAT-4425	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
54	FJAT-4426	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+
55	FJAT-4427	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
56	FJAT-4434	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
57	FJAT-4437	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+
58	FJAT-4466	*B. megatherium*	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
59	FJAT-4467	*B. megatherium*	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+
60	FJAT-4468	*B. megatherium*	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+
61	FJAT-4469	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+
62	FJAT-4488	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+
63	FJAT-4489	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	+−	−	−	−	+
64	FJAT-4497	*B. megatherium*	−	−	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−
65	FJAT-4501	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−
66	FJAT-4503	*B. megatherium*	−	−	+	+	+−	−	+	−	−	+	−	−
67	FJAT-4509	*B. megatherium*	−	−	+	+	+−	−	+	−	−	+	−	+
68	FJAT-4510	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−
69	FJAT-4511	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−
70	FJAT-4514	*B. megatherium*	+	−	+	+	+−	−	−	−	−	+	−	−
71	FJAT-4524	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+
72	FJAT-4525	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+
73	FJAT-4545	*B. megatherium*	+	−	+		+	−	+	−	−	+	−	+
74	FJAT-4550	*B. megatherium*	−	+	+	−	+−	−	−	−	+	−	+	+
75	FJAT-4551	*B. megatherium*	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
76	FJAT-4552	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+
77	FJAT-4565	*B. megatherium*	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	+
78	FJAT-4568	*B. megatherium*	−	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−
79	FJAT-4570	*B. megatherium*	−	+	+	−	+	−	+	+	−	+	−	+
80	FJAT-4579	*B. megatherium*	−	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	+
81	FJAT-4584	*B. megatherium*	+	−	+	+−	+	+	−	+	−	−	−	+
82	FJAT-4585	*B. megatherium*	−	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	+
83	FJAT-4596	*B. megatherium*	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−
84	FJAT-4599	*B. megatherium*	−	+	+	−	+	+	+	+	−	−	−	+
85	FJAT-4607	*B. megatherium*	−	+	+	−	+−	+	+	+	−	+	−	−
86	FJAT-4608	*B. megatherium*	−	−	+	−	+−	+	−	+	−	+	−	−
87	FJAT-4612	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+

续表

	菌株编号	种名	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
88	FJAT-4621	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+
89	FJAT-4640	*B. megatherium*	+	−	+	−	+	+	+	+	−	+	−	+
90	FJAT-4641	*B. megatherium*	+	+	+	+	+	+	+−	−	−	+	−	+
91	FJAT-4716	*B. megatherium*	+	−	+	−	+−	+	+	+	−	+	+	+
92	FJAT-4737	*B. megatherium*	−	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+
93	FJAT-4388	*B. mycoides*	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
94	FJAT-4390	*B. mycoides*	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	+
95	FJAT-4392	*B. mycoides*	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	−	+
96	FJAT-4527	*B. mycoides*	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+
97	FJAT-4540	*B. mycoides*	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+
98	FJAT-4541	*B. mycoides*	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	−	+
99	FJAT-4547	*B. mycoides*	−	−	+	+	−	−	−	+	+	+	−	+
100	FJAT-4636	*B. mycoides*	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	+
101	FJAT-4721	*B. mycoides*	+	−	+	−	+−	+	+	+	−	+	+	−
102	FJAT-4749	*B. mycoides*	+	−	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+
103	FJAT-4753	*B. mycoides*	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
104	FJAT-4400	*B. pumilus*	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	+
105	FJAT-4479	*B. pumilus*	−	+	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+
106	FJAT-4500	*B. pumilus*	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	+
107	FJAT-4512	*B. pumilus*	−	−	+	+	+−	−	+	−	−	+	−	−
108	FJAT-4563	*B. pumilus*	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	+
109	FJAT-4598	*B. pumilus*	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	+
110	FJAT-4605	*B. pumilus*	−	+	+	−	+−	+	−	+	+	−	−	+
111	FJAT-4657	*B. pumilus*	+	−	+	−	+−	−	+	+	+	+	−	+
112	FJAT-4385	*L. sphaericus*	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+
113	FJAT-4557	*L. sphaericus*	+	−	+	+	−	+	−	−	−	+	−	+
114	FJAT-4678	*L. sphaericus*	−	−	+	+	−	+	−	−	−	+	−	+
115	FJAT-4746	*L. sphaericus*	−	−	+	+	−	+	+	−	−	−	−	+
116	FJAT-4410	*B. subtilis*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+
117	FJAT-4428	*B. subtilis*	−	−	+	−	+	−	+	−	+	+	−	+
118	FJAT-4465	*B. subtilis*	−	−	−	+	+	−	+	−	+	+	−	+
119	FJAT-4475	*B. subtilis*	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+
120	FJAT-4481	*B. subtilis*	−	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+
121	FJAT-4492	*B. subtilis*	−	+	−	+	+	−	−	+−	+	−	−	+
122	FJAT-4581	*B. subtilis*	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	−	+

续表

	菌株编号	种名	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
123	FJAT-4604	*B. subtilis*	−	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+
124	FJAT-4471	*P. polymyxa*	−	−	−	−	+	+	−	−	+	+	−	+
125	FJAT-4472	*P. polymyxa*	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	−	+
126	FJAT-4537	*P. polymyxa*	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−
127	FJAT-4539	*P. polymyxa*	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−
128	FJAT-4543	*P. polymyxa*	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−
129	FJAT-4544	*P. polymyxa*	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	−	−
130	FJAT-4575	*P. polymyxa*	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+	−	+

将表1-27进行数量化，“−”用0代表，“+−”用1代表，“+”用2代表，建立矩阵见表1-28。以生理生化特性为指标，以芽胞杆菌为样本，相关系数为尺度，用类平均法进行系统聚类，分析结果见图1-53。从图1-53可知，采集的芽胞杆菌根据生理生化特征分为4类。聚类结果说明：①芽胞杆菌种类亚类集聚类别分散型，有些芽胞杆菌生理生化指标表现出亚类多样性，同一种类不同来源的菌株可以在聚类的过程中形成自己的亚类别，各亚类出现在不同的类别中，如巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*），不同来源菌株都形成自己的亚类，但是分散在各个类别中。②芽胞杆菌种类分散型，有些芽胞杆菌生理生化特性非常分散，如枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）各菌株在4类中都有分布。有些芽胞杆菌同一种生理生化指标可以有较大区别，与其他种类聚为一类，如深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*），基本分散在4个类型中。③芽胞杆菌种类集中分布型，有些芽胞杆菌生理生化特征比较集中，如多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*），大部分自成一类，分布在第1类中，这与其属于类芽胞杆菌属有关，显著区别于芽胞杆菌属。

表1-28　国内分离鉴定的芽胞杆菌生理生化特性数量化

芽胞杆菌菌株	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
1 *B. atrophaeus* FJAT-4399	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2
2 *B. atrophaeus* FJAT-4403	0	0	2	2	2	0	2	0	2	2	0	2
3 *B. atrophaeus* FJAT-4404	0	2	2	2	2	2	2	0	0	2	0	2
4 *B. atrophaeus* FJAT-4470	0	0	2	2	2	0	0	0	2	2	0	2
5 *B. atrophaeus* FJAT-4483	0	2	2	2	2	0	0	2	2	2	0	2
6 *B. atrophaeus* FJAT-4495	0	0	2	0	2	0	0	1	2	0	0	2
7 *B. atrophaeus* FJAT-4520	0	0	2	2	2	0	2	0	2	2	0	2
8 *B. atrophaeus* FJAT-4580	2	2	2	2	2	0	2	0	2	2	0	2
9 *B. atrophaeus* FJAT-4582	2	0	2	2	1	2	0	0	2	2	0	2

续表

芽胞杆菌菌株	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
10 *B. atrophaeus* FJAT-4589	2	2	2	0	2	2	2	0	2	2	0	2
11 *B. atrophaeus* FJAT-4590	0	0	2	0	2	2	2	0	2	2	0	2
12 *B. atrophaeus* FJAT-4620	2	0	2	2	2	2	2	0	2	2	0	2
13 *B. atrophaeus* FJAT-4643	2	2	2	0	2	2	0	0	2	2	0	2
14 *B. atrophaeus* FJAT-4750	2	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2
15 *B. atrophaeus* FJAT-4751	2	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	2
16 *B. cereus* FJAT-4382	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2
17 *B. cereus* FJAT-4386	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	0	2
18 *B. cereus* FJAT-4398	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	0	2
19 *B. cereus* FJAT-4409	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2
20 *B. cereus* FJAT-4414	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2
21 *B. cereus* FJAT-4418	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2
22 *B. cereus* FJAT-4419	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2
23 *B. cereus* FJAT-4476	0	0	2	2	2	0	0	2	2	2	0	2
24 *B. cereus* FJAT-4478	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0	2
25 *B. cereus* FJAT-4521	0	0	0	2	2	0	0	2	0	2	0	2
26 *B. cereus* FJAT-4542	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0	2
27 *B. cereus* FJAT-4556	0	0	0	2	2	2	0	2	0	2	0	2
28 *B. cereus* FJAT-4558	2	0	2	0	1	0	2	2	2	2	0	2
29 *B. cereus* FJAT-4577	2	0	2	2	1	0	2	2	2	2	0	2
30 *B. cereus* FJAT-4609	0	0	2	2	0	2	2	2	0	2	0	2
31 *B. cereus* FJAT-4610	0	0	2	2	0	2	1	2	2	0	0	2
32 *B. cereus* FJAT-4633	0	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2
33 *B. cereus* FJAT-4634	0	2	2	2	1	2	0	2	2	2	0	2
34 *B. cereus* FJAT-4645	1	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0	2
35 *B. cereus* FJAT-4655	0	2	2	2	1	2	2	0	0	2	0	2
36 *B. cereus* FJAT-4656	2	0	2	0	1	2	2	1	0	0	0	2
37 *B. licheniformis* FJAT-4415	2	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2
38 *B. licheniformis* FJAT-4431	0	0	2	0	2	0	2	2	2	0	0	2
39 *B. licheniformis* FJAT-4646	2	2	2	0	2	0	0	2	2	0	0	2
40 *B. licheniformis* FJAT-4648	2	0	2	2	2	0	0	2	2	0	0	2
41 *B. megatherium* FJAT-4394	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	0
42 *B. megatherium* FJAT-4395	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	0
43 *B. megatherium* FJAT-4396	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	0
44 *B. megatherium* FJAT-4401	0	0	2	0	0	0	2	0	2	2	0	2
45 *B. megatherium* FJAT-4406	0	2	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2

续表

芽胞杆菌菌株	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
46 *B. megatherium* FJAT-4407	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
47 *B. megatherium* FJAT-4412	2	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
48 *B. megatherium* FJAT-4416	2	0	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2
49 *B. megatherium* FJAT-4417	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
50 *B. megatherium* FJAT-4420	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2
51 *B. megatherium* FJAT-4421	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
52 *B. megatherium* FJAT-4422	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
53 *B. megatherium* FJAT-4425	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
54 *B. megatherium* FJAT-4426	0	0	2	2	2	0	2	0	2	2	0	2
55 *B. megatherium* FJAT-4427	0	0	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
56 *B. megatherium* FJAT-4434	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2
57 *B. megatherium* FJAT-4437	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2
58 *B. megatherium* FJAT-4466	0	2	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2
59 *B. megatherium* FJAT-4467	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2
60 *B. megatherium* FJAT-4468	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2
61 *B. megatherium* FJAT-4469	0	0	2	2	2	0	0	2	0	0	0	2
62 *B. megatherium* FJAT-4488	0	0	2	2	2	0	0	0	0	2	0	2
63 *B. megatherium* FJAT-4489	0	0	2	2	2	0	2	1	0	0	0	2
64 *B. megatherium* FJAT-4497	0	0	2	2	0	0	2	0	0	2	0	0
65 *B. megatherium* FJAT-4501	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	0
66 *B. megatherium* FJAT-4503	0	0	2	2	1	0	2	0	0	2	0	0
67 *B. megatherium* FJAT-4509	0	0	2	2	1	0	2	0	0	2	0	2
68 *B. megatherium* FJAT-4510	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	0
69 *B. megatherium* FJAT-4511	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	0
70 *B. megatherium* FJAT-4514	2	0	2	2	1	0	0	0	0	2	0	0
71 *B. megatherium* FJAT-4524	0	0	2	2	2	2	2	0	0	2	0	2
72 *B. megatherium* FJAT-4525	0	0	2	2	2	2	2	0	0	2	0	2
73 *B. megatherium* FJAT-4545	2	0	2		2	0	2	0	0	2	0	2
74 *B. megatherium* FJAT-4550	0	2	2	0	1	0	0	0	2	0	2	2
75 *B. megatherium* FJAT-4551	2	2	2	2	2	0	2	2	0	2	0	2
76 *B. megatherium* FJAT-4552	0	0	2	2	2	0	0	0	0	2	0	2
77 *B. megatherium* FJAT-4565	2	2	2	2	2	0	2	2	0	0	0	2
78 *B. megatherium* FJAT-4568	0	2	2	2	2	0	2	2	0	2	0	0
79 *B. megatherium* FJAT-4570	0	2	2	0	2	0	2	2	0	2	0	2
80 *B. megatherium* FJAT-4579	0	2	2	2	2	0	2	2	0	0	0	2
81 *B. megatherium* FJAT-4584	2	0	2	1	2	2	0	2	0	0	0	2

续表

芽胞杆菌菌株	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
82 *B. megatherium* FJAT-4585	0	2	2	0	2	2	0	2	0	0	0	2
83 *B. megatherium* FJAT-4596	2	0	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0
84 *B. megatherium* FJAT-4599	0	2	2	0	2	2	2	2	0	0	0	2
85 *B. megatherium* FJAT-4607	0	2	2	0	1	2	2	2	0	2	0	0
86 *B. megatherium* FJAT-4608	0	0	2	0	1	2	0	2	0	2	0	0
87 *B. megatherium* FJAT-4612	0	0	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2
88 *B. megatherium* FJAT-4621	0	0	2	2	2	2	2	0	2	0	0	2
89 *B. megatherium* FJAT-4640	2	0	2	0	2	2	2	2	0	2	0	2
90 *B. megatherium* FJAT-4641	2	2	2	2	2	2	1	0	0	2	0	2
91 *B. megatherium* FJAT-4716	2	0	2	0	1	2	2	2	0	2	2	2
92 *B. megatherium* FJAT-4737	0	0	2	2	2	2	2	2	0	2	0	2
93 *B. mycoides* FJAT-4388	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2
94 *B. mycoides* FJAT-4390	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	0	2
95 *B. mycoides* FJAT-4392	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	0	2
96 *B. mycoides* FJAT-4527	0	0	2	2	2	0	0	0	0	2	0	2
97 *B. mycoides* FJAT-4540	0	0	0	2	0	0	0	2	0	2	0	2
98 *B. mycoides* FJAT-4541	0	0	0	2	0	0	0	2	0	2	0	2
99 *B. mycoides* FJAT-4547	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0	2
100 *B. mycoides* FJAT-4636	0	0	2	2	2	2	0	0	0	2	0	2
101 *B. mycoides* FJAT-4721	2	0	2	0	1	2	2	2	0	2	2	0
102 *B. mycoides* FJAT-4749	2	0	2	2	2	2	0	2	0	2	0	2
103 *B. mycoides* FJAT-4753	0	0	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
104 *B. pumilus* FJAT-4400	0	2	2	2	2	0	0	2	2	2	0	2
105 *B. pumilus* FJAT-4479	0	2	2	2	2	0	0	2	2	0	0	2
106 *B. pumilus* FJAT-4500	0	0	2	2	2	0	0	2	2	2	0	2
107 *B. pumilus* FJAT-4512	0	0	2	2	1	0	2	0	0	2	0	0
108 *B. pumilus* FJAT-4563	0	2	2	0	2	0	2	2	0	0	0	2
109 *B. pumilus* FJAT-4598	0	2	2	2	2	2	0	2	2	0	0	2
110 *B. pumilus* FJAT-4605	0	2	2	0	1	2	0	2	2	0	0	2
111 *B. pumilus* FJAT-4657	2	0	2	0	1	0	2	2	2	2	0	2
112 *L. sphaericus* FJAT-4385	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	2
113 *L. sphaericus* FJAT-4557	2	0	2	2	0	2	0	0	0	2	0	2
114 *L. sphaericus* FJAT-4678	0	0	2	2	0	2	0	0	0	2	0	2
115 *L. sphaericus* FJAT-4746	0	0	2	2	0	2	2	0	0	0	0	2
116 *B. subtilis* FJAT-4410	0	0	2	2	2	0	2	0	0	2	0	2
117 *B. subtilis* FJAT-4428	0	0	2	0	2	0	2	0	2	2	0	2

续表

芽胞杆菌菌株	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
118 *B. subtilis* FJAT-4465	0	0	0	2	2	0	2	0	2	2	0	2
119 *B. subtilis* FJAT-4475	0	0	2	2	2	0	0	0	2	2	0	2
120 *B. subtilis* FJAT-4481	0	0	2	2	2	0	0	2	2	0	0	2
121 *B. subtilis* FJAT-4492	0	2	0	2	2	0	0	1	2	0	0	2
122 *B. subtilis* FJAT-4581	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0	2
123 *B. subtilis* FJAT-4604	0	2	2	0	2	2	0	0	2	2	0	2
124 *P. polymyxa* FJAT-4471	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2	0	2
125 *P. polymyxa* FJAT-4472	0	0	0	2	2	2	0	0	2	2	0	2
126 *P. polymyxa* FJAT-4537	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	0	0
127 *P. polymyxa* FJAT-4539	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	0	0
128 *P. polymyxa* FJAT-4543	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	0	0
129 *P. polymyxa* FJAT-4544	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	0	0
130 *P. polymyxa* FJAT-4575	0	0	0	0	2	0	2	2	2	2	0	2

三、芽胞杆菌国内采集菌株的生理生化特性聚类分析

利用表 1-29 数据，对芽胞杆菌的生理生化特性概率值进行分析，用欧氏距离，以类平均法进行系统聚类，分析结果见图 1-54。当 λ=23 时，被测芽胞杆菌可以分为 3 类。第 1 类包括多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）。第 2 类包括球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）。第 3 类包括巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）、深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）、地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）。芽胞杆菌种的聚类反映了基于生理生化特性的系统发育。

表 1-29　国内分离鉴定的芽胞杆菌生理生化特性概率值

类别	种名	丙二酸利用	柠檬酸盐利用	接触酶	氧化酶	蔗糖发酵	葡萄糖发酵	淀粉水解	MR	V-P	硝酸盐还原	吲哚	明胶液化
3	*B. atrophaeus*	0.47	0.33	1.00	0.71	0.93	0.60	0.60	0.27	0.80	0.80	0.00	1.00
	B. licheniformis	0.00	0.25	1.00	0.50	1.00	0.00	0.50	0.75	0.75	0.25	0.00	1.00
	B. pumilus	0.13	0.63	1.00	0.50	1.00	0.25	0.38	0.88	0.75	0.50	0.00	0.88
	B. subtilis	0.13	0.38	0.75	0.63	1.00	0.25	0.50	0.38	0.75	0.75	0.00	1.00
	B. cereus	0.19	0.14	0.90	0.81	0.67	0.33	0.62	0.90	0.77	0.95	0.00	1.00
	B. mycoides	0.18	0.00	0.73	0.75	0.45	0.27	0.36	0.82	0.36	1.00	0.09	1.00
	B. megatherium	0.21	0.25	0.98	0.87	0.98	0.31	0.85	0.54	0.10	0.75	0.04	0.75
2	*L. sphaericus*	0.25	0.00	1.00	1.00	0.00	0.75	0.25	0.00	0.00	0.75	0.00	1.00
1	*P. polymyxa*	0.57	0.00	0.00	0.29	1.00	0.88	0.71	0.14	1.00	1.00	0.00	0.43

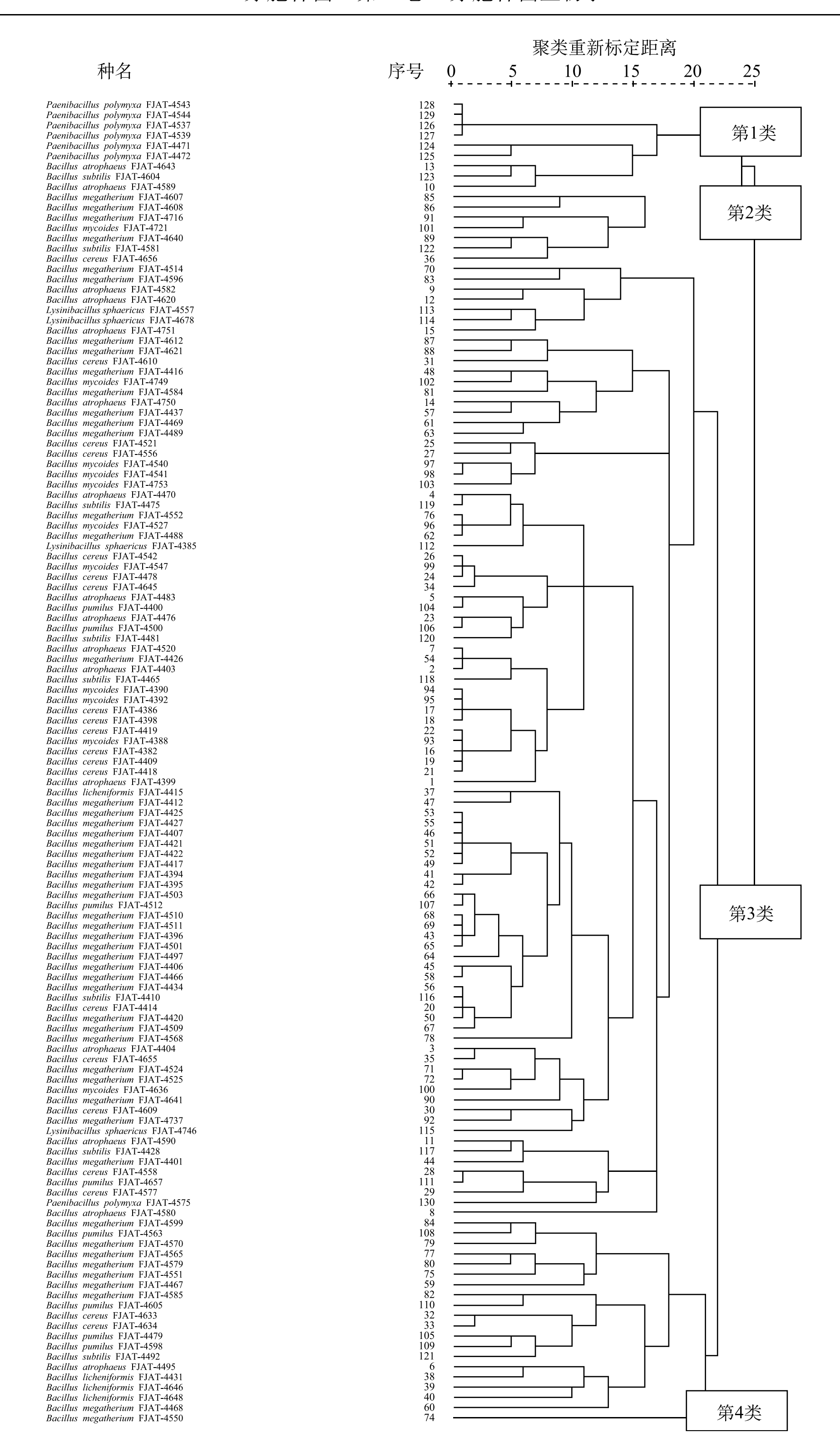


图 1-53　国内分离鉴定的芽胞杆菌生理生化特性聚类分析

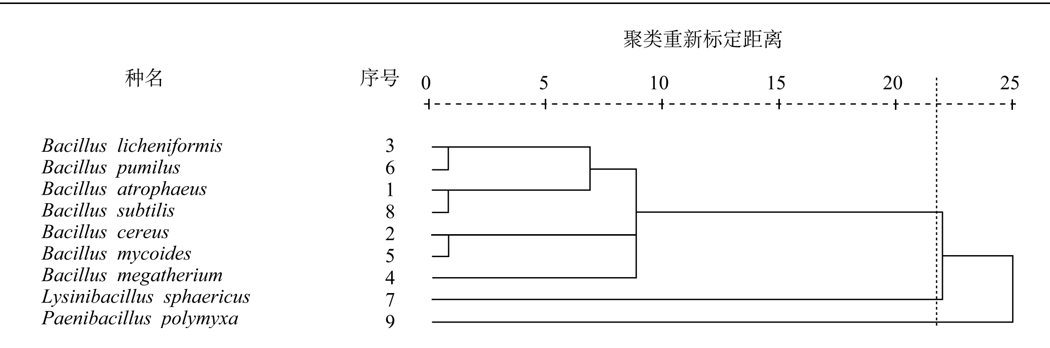


图 1-54　基于生理生化特性概率值的国内分离鉴定的芽胞杆菌聚类分析

四、芽胞杆菌标准菌株的生理生化特性

芽胞杆菌标准菌株分别引自不同国家菌种保存中心，如 DSMZ（德国）、CCUG（瑞典）、ATCC（美国），其库存菌株编号、种名、生理生化特征见表 1-30。以 1 为反应阳性（+），0 为反应阴性（–），进行转换。

表 1-30　芽胞杆菌标准菌株的生理生化特性

库存菌株编号	种名	淀粉水解	明胶液化	氧化酶	接触酶	V-P	柠檬酸盐利用	阿拉伯糖	葡萄糖发酵	甘油	木糖	水杨苷	硝酸盐还原
FJAT-14221	*B. acidiceler*	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
FJAT-14829	*B. acidicola*	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
FJAT-14209	*B. acidiproducens*	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
FJAT-10013	*B. agaradhaerens*	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
FJAT-276	*B. alacalphilus*	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
FJAT-2286	*B. alkalitelluris*	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
FJAT-10025	*B. altitudinis*	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
FJAT-8754	*B. amyloliquefaciens*	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
FJAT-14220	*B. aryabhattai*	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
FJAT-8755	*B. atrophaeus*	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-8757	*B. badius*	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
FJAT-10043	*B. bataviensis*	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
FJAT-14214	*B. beijingensis*	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
FJAT-14268	*B. boroniphilus*	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
FJAT-14236	*B. butanolivorans*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FJAT-10029	*B. carboniphilus*	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-10015	*B. cellulosilyticus*	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
FJAT-8760	*B. cereus*	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
FJAT-14272	*B. cibi*	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0

续表

库存菌株编号	种名	淀粉水解	明胶液化	氧化酶	接触酶	V-P	柠檬酸盐利用	阿拉伯糖	葡萄糖发酵	甘油	木糖	水杨苷	硝酸盐还原
FJAT-8761	*B. circulans*	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
FJAT-8762	*B. clausii*	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
FJAT-520	*B. coagulans*	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
FJAT-10017	*B. cohnii*	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
FJAT-14222	*B. decisifrondis*	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FJAT-14274	*B. decolorationis*	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
FJAT-10044	*B. drentensis*	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
FJAT-10010	*B. endophyticus*	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
FJAT-274	*B. fastidiosus*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-8765	*B. flexus*	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
FJAT-10032	*B. fordii*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-10033	*B. fortis*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-8766	*L. fusiformis*	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-10034	*B. galactosidilyticus*	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
FJAT-10035	*B. gelatini*	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
FJAT-14270	*B. ginsengihumi*	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
FJAT-519	*B. globisporus*	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FJAT-10037	*B. hemicellulosilyticus*	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
FJAT-14233	*B. horikoshii*	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
FJAT-14211	*B. humi*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FJAT-14212	*B. indicus*	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-14252	*B. isronensis*	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FJAT-14210	*B. koreensis*	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
FJAT-14240	*B. kribbensis*	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
FJAT-14213	*B. lehensis*	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1
FJAT-275	*B. lentimorbus*	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
FJAT-8771	*B. licheniformis*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-14206	*B. luciferensis*	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
FJAT-14248	*B. macyae*	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
FJAT-14235	*B. marisflavi*	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
FJAT-8773	*B. massiliensis*	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
FJAT-8774	*B. megatherium*	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-10005	*B. mojavensis*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-14208	*B. muralis*	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1
FJAT-14258	*B. murimartini*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1

续表

库存菌株编号	种名	淀粉水解	明胶液化	氧化酶	接触酶	V-P	柠檬酸盐利用	阿拉伯糖	葡萄糖发酵	甘油	木糖	水杨苷	硝酸盐还原
FJAT-8775	*B. mycoides*	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
FJAT-14216	*B. nealsonii*	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
FJAT-14217	*B. niabensis*	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
FJAT-14202	*B. niacini*	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1
FJAT-14227	*B. novalis*	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
FJAT-14201	*L. odysseyi*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-2235	*B. okhensis*	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
FJAT-14823	*B. okuhidensis*	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
FJAT-14224	*B. oleronius*	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
FJAT-2285	*B. panaciterrae*	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
FJAT-10053	*V. pantothenticus*	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
FJAT-14218	*B. patagoniensis*	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
FJAT-14237	*B. pseudalcaliphilus*	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0
FJAT-14225	*B. pseudomycoides*	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1
FJAT-8778	*B. psychrosaccharolyticus*	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
FJAT-14255	*B. psychrotolerans*	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FJAT-8779	*B. pumilus*	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
FJAT-14825	*B. ruris*	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
FJAT-14260	*B. safensis*	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
FJAT-14262	*B. selenatarsenatis*	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
FJAT-14261	*B. selenitireducens*	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FJAT-14231	*B. seohaeanensis*	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
FJAT-14257	*B. shackletonii*	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
FJAT-2295	*B. simplex*	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1
FJAT-14822	*B. siralis*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
FJAT-14232	*B. soli*	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
FJAT-14256	*B. sonorensis*	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
FJAT-9	*L. sphaericus*	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-8784	*B. subtilis*	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FJAT-14	*B. thuringiensis*	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
FJAT-14844	*B. vallismortis*	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
FJAT-14842	*B. vedderi*	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
FJAT-14850	*B. vietnamensis*	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0

五、芽胞杆菌标准菌株的生理生化特性聚类分析

利用表 1-28 数据，对芽胞杆菌的生理生化特性概率值进行分析，用欧氏距离，以类平均法进行系统聚类，分析结果见图 1-55。当 λ=23 时，被测芽胞杆菌可以分为 5 类。第 1 类是以枯草芽胞杆菌为代表的 12 个种。第 2 类是以简单芽胞杆菌为代表的 7 个种。第 3 类是以克劳氏芽胞杆菌为代表的 15 个种。第 4 类是以蜡状芽胞杆菌为代表的 24 个种。第 5 类是以球形赖氨酸芽胞杆菌为代表的 29 个种。

六、讨论

芽胞杆菌生理生化特征的分析属于经典分类法的范畴，作为一种根据生物表型特征相似性的分类方法，其聚类结构所表示的是一种表型关系，并不能直接反映生物的系统发育关系；此外，在获取经典分类性状时，很大程度上取决于观察者的主观判断，这会影响到分析结果；最重要的是，依据表型特征进行的经典分类能够体现出细菌的形态多样性，可描述的细菌的表型性状越多，描述的信息越丰富，得到的聚类结果就越可靠。

本研究中，对芽胞杆菌生理生化反应特性表明，依据芽胞杆菌的生理生化特性作为经典分类性状，大多数芽胞杆菌接触酶反应、氧化酶反应、葡萄糖发酵、淀粉水解等呈阳性，吲哚反应、柠檬酸反应、葡萄糖发酵、硫化氢反应等呈阴性。尽管目前大多数情况下都是利用 DNA 水平进行种的分类，但经典分类法也有助于在种属水平上划清芽胞杆菌的关系，通常认为经典分类和 DNA 同源分类所得到的结果是一致的。随着科技的发展，新型经典分类软件的开发应用对芽胞杆菌分类的精确性将发挥越来越重要的作用，为形成聚类及生物的经典分类提供新的思路和方法。

对国内分离的 9 个芽胞杆菌 130 个菌株 12 个生理生化特性，包括丙二酸利用、柠檬酸盐利用、接触酶、氧化酶、蔗糖发酵、葡萄糖发酵、淀粉水解、MR、V-P、硝酸盐还原、吲哚、明胶液化等进行测定结果表明，同个芽胞杆菌种，其生理生化特性差异很大，不同种芽胞杆菌可能具有相同的生理生化指标。这种差异表现在不同的生理生化指标上，有的指标在同种芽胞杆菌中表现比较稳定，有的指标则变化很大。

从 DSMZ、CCUG、ATCC 等引进的芽胞杆菌标准菌株 87 种，测定其生理生化指标，包括了淀粉水解、明胶液化、氧化酶、接触酶、V-P、柠檬酸利用、阿拉伯糖、葡萄糖、甘油、木糖、水杨苷、硝酸盐还原等，研究结果表明不同种类芽胞杆菌总是可以通过生理生化相互区别，有的种类区别大，有的种类区别小。

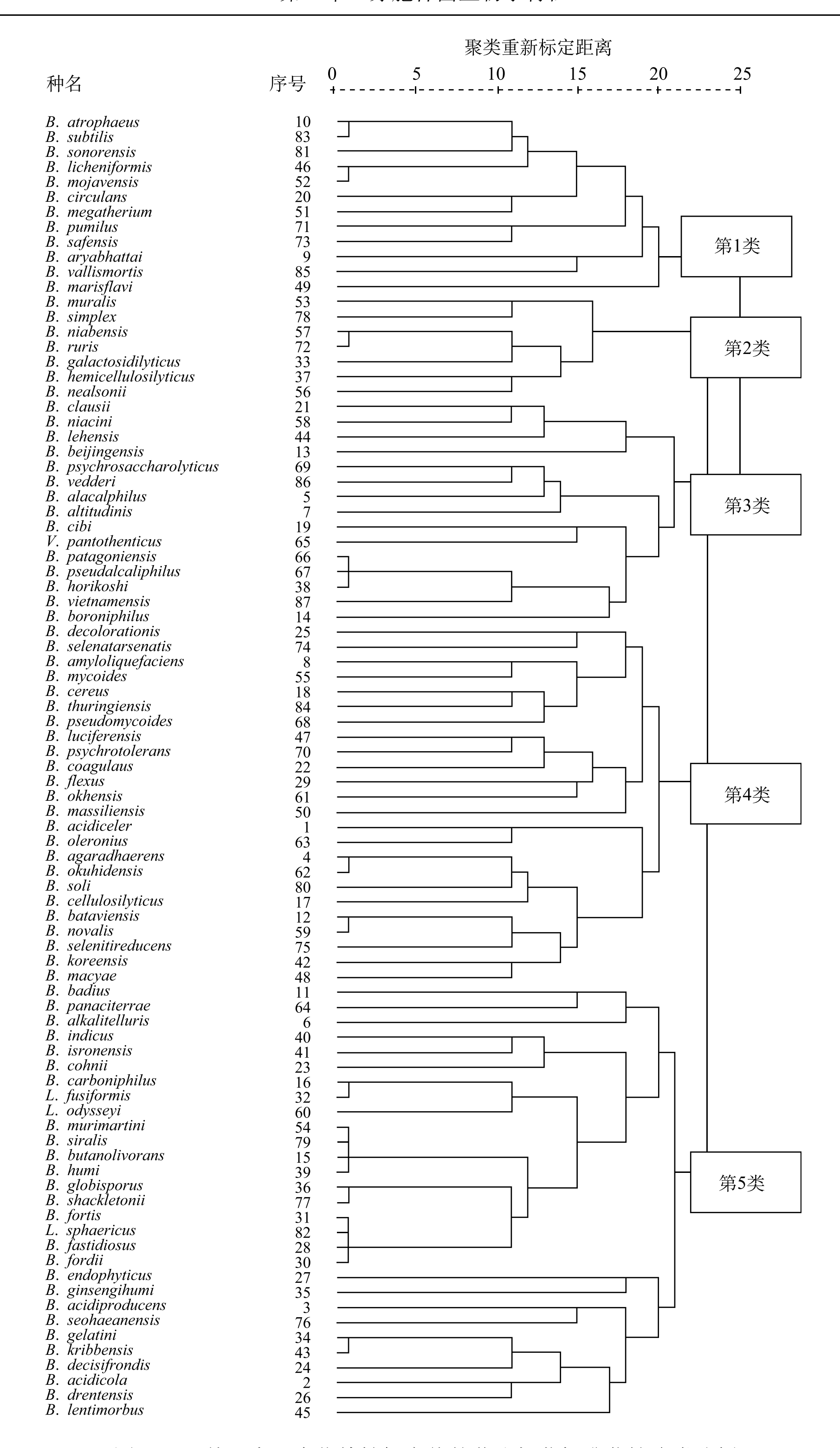


图 1-55　基于生理生化特性概率值的芽胞杆菌标准菌株聚类分析

第二章　芽胞杆菌酶学特性

第一节　芽胞杆菌酶学研究进展

一、芽胞杆菌产酶特性研究进展

1. 芽胞杆菌酶的类型

芽胞杆菌属（*Bacillus*）是一类好氧或兼型厌氧，在一定条件下能产生抗逆性内生孢子的有机化能异养型杆状细菌，一般为革兰氏阳性。它在自然界分布非常广泛，生理特性丰富多样，主要分布在土壤、植物体表面及水体中，在快速繁殖过程中能产生多种维生素、有机酸、氨基酸、蛋白酶（特别是碱性蛋白酶）、糖化酶、脂肪酶、淀粉酶等。由于它们能产生对热、紫外线、电磁辐射和某些化学药品有很强抗性的芽胞，能耐受多种不良环境。芽胞杆菌中存在很多特殊功能的菌株，在农业、医学、工业、军事和环境污染治理等领域有广泛的应用价值，有的可以在高渗透压、强酸性、强碱性、高寒的环境下良好生长繁殖，有非常高的生态学价值；有的可分泌多种胞外酶，应用于酶制剂工业；有的可作为多种蛋白质基因表达受体，在基因工程和生物学研究领域中有较高的应用价值；大多数芽胞杆菌与动植物关系密切并与其形成良好的共生体系，应用于益生菌制剂、微生物有机肥料的生产；有的菌种能产生毒杀昆虫的特殊蛋白，如苏云金芽胞杆菌能产生 δ-内毒素，又称杀虫晶体蛋白（insecticidal crystal protein，ICP），可毒杀鳞翅目、双翅目、鞘翅目等的昆虫，用于微生物农药的生产或生物防治。由于芽胞杆菌属在自然界的广泛分布及其产生芽胞的特性，它已经成为很多研究领域高度重视的微生物类群。目前，在工业应用的有枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌、凝结芽胞杆菌。芽胞杆菌酶的分类如下。

（1）淀粉酶

淀粉酶是能够分解淀粉糖苷键的一类酶的总称，包括 α-淀粉酶、β-淀粉酶、糖化酶和异淀粉酶。α-淀粉酶又称淀粉 1,4-糊精酶，能够切开淀粉链内部的 α-1,4-糖苷键，将淀粉水解为麦芽糖、含有 6 个葡萄糖单位的寡糖和带有支链的寡糖。生产此酶的微生物主要有枯草芽胞杆菌、黑曲霉、米曲霉和根霉。β-淀粉酶又称为淀粉 1,4-麦芽糖苷酶，能够从淀粉分子非还原性末端切开 1,4-糖苷键，生成麦芽糖。此酶作用于淀粉的产物是麦芽糖与极限糊精。此酶主要由曲霉、根霉和内孢霉产生。糖化酶又称为淀粉 α-1,4-葡萄糖苷酶，此酶作用于淀粉分子的非还原性末端，以葡萄糖为单位，依次作用于淀粉分子中的 α-1,4-糖苷键，生成葡萄糖。此酶作用于支链淀粉后的产物有葡萄糖和带有 α-1,6-糖苷键的寡糖；作用于直链淀粉后的产物几乎全部是葡萄糖。此酶产生菌主要是黑曲霉（左美曲霉、泡盛曲霉）、根霉（雪白根霉、德氏根霉）、拟内孢霉、红曲霉。异淀粉酶又称为淀粉 α-1,6-葡萄糖苷酶、分支酶，此酶作用于支链淀粉分子分支点处的 α-1,6-

糖苷键，将支链淀粉的整个侧链切下变成直链淀粉。此酶产生菌主要是嫌气杆菌、芽胞杆菌及某些假单胞杆菌等细菌。

（2）蛋白酶

蛋白酶是催化分解蛋白质肽键的一群酶的总称，它作用于蛋白质，将其分解为蛋白胨、多肽及游离氨基酸。此酶种类繁多，广泛存在于所有生物体内，按其来源可分为植物蛋白酶、动物蛋白酶、微生物蛋白酶（又可分为细菌蛋白酶、放线菌蛋白酶、霉菌蛋白酶等）；按其作用形式可分为肽链内切酶、肽链外切酶；按所产蛋白酶性能分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶。酸性蛋白酶（最适 pH2～5）产生菌主要是黑曲霉、米曲霉、根霉、微小毛霉、拟青霉、青霉、血红色螺孔菌等的某些种；中性蛋白酶（最适 pH7～8）产生菌主要是枯草芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌、米曲霉、栖土曲霉、灰色链霉菌、微白色链霉菌、耐热性解蛋白质杆菌等；碱性蛋白酶（最适 pH9～11）主要产生菌为枯草芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌、米曲霉、栖土曲霉、灰色链霉菌、镰刀菌等。微生物产生的蛋白酶大多是几种酶的混合物，只不过有主次之分。另外，改变培养基的组成或者菌种经诱变，可以改变产酶的性能，据报道，黑曲霉的变株可生产碱性蛋白酶，米曲霉的变株可生产酸性蛋白酶。

（3）纤维素酶

纤维素酶是降解纤维素 β-1,4-葡萄糖苷键的一类酶的总称，因此纤维素酶又有纤维素酶复合物之称。通常认为主要包括 C1 酶、CX 酶和 β-葡萄糖苷酶。C1 酶主要作用于天然纤维素，将其转变成水合非结晶纤维素；CX 酶又可分为 CX1 酶和 CX2 酶，CX1 酶是内断型纤维素酶，它从水合非结晶纤维素分子内部作用于 β-1,4-糖苷键，生成纤维糊精和纤维二糖，CX2 酶为外断型纤维素酶，它从水合非结晶纤维素分子的非还原性末端作用于 β-葡萄糖苷酶，又称纤维二糖酶，它作用于纤维二糖，生成葡萄糖。这些酶协同作用可将纤维素彻底降解为还原糖——葡萄糖。纤维素酶可破解富含纤维的细胞壁，使其包含的蛋白质、淀粉等营养物质释放出来并加以利用，同时又可将纤维降解为可被畜禽机体消化吸收的还原糖，从而提高饲料利用率。产生纤维素酶的微生物研究较多的是真菌，对细菌和放线菌研究很少。当前用来生产纤维素酶的微生物主要是木霉、黑曲霉、青霉和根霉，此外，漆斑霉、反刍动物瘤胃菌、嗜纤维菌、产黄纤维单胞菌、侧芽胞杆菌、黏细菌、梭状芽胞杆菌等也能产生纤维素酶。由于纤维素酶难以提纯，实际应用的纤维素酶（尤其在饲料工业中）一般还含有半纤维素酶和其他相关的酶如果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等。

（4）半纤维素酶

半纤维素酶是分解半纤维素的一类酶的总称，主要包括 β-葡聚糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶和甘露聚糖酶。这些酶的主要作用就是降解畜禽消化道内的非淀粉多糖，降低肠道内容物的黏性，促进营养物质的消化吸收，减少畜禽下痢，从而促进畜禽生长和提高饲料利用率。半纤维素酶主要由各种曲霉、根霉、木霉发酵产生。在饲料工业中应用较多的是 β-葡聚糖酶，它主要由曲霉、木霉和杆菌属类微生物产生，它应用于以大麦替代玉米的日粮中，借以降低饲养成本，而达到与玉米相同的饲喂效果。

（5）果胶酶

果胶酶是分解果胶的酶的通称，也是一个多酶复合物，它通常包括原果胶酶、果胶甲酯水解酶、果胶酸酶 3 种酶。这 3 种酶的联合作用使果胶质得以完全分解。天然的果胶质在原果胶酶作用下，被转化成水可溶性的果胶；果胶被果胶甲酯水解酶催化去掉甲酯基团，生成果胶酶；果胶酸酶切断果胶酸中的 α-1,4-糖苷键，生成半乳糖醛酸，半乳糖醛酸进入糖代谢途径被分解放出能量。工业生产果胶酶的菌种主要是霉菌，常用菌种有文氏曲霉、苹果青霉、黑曲霉、白腐核菌、米曲霉、酵母菌等，此外，木质壳霉、芽胞杆菌、葡萄孢霉、镰刀霉也能产生果胶酶。饲料工业中果胶酶多用于提高青贮饲料的品质。

（6）脂肪酶

脂肪酶作用于脂肪中的酯键，将脂肪分解成脂肪酸和甘油。生产脂肪酶的微生物主要有假丝酵母、圆酵母、黑曲霉、根霉、白腐核菌、白地霉、青霉、毛霉、镰刀霉及假单胞菌、无色杆菌、葡萄球菌等，而芽胞杆菌脂肪酶含量较少。

（7）植酸酶

植酸酶是降解饲料中植酸及其盐的酶。饲料中玉米、大豆、豆饼及谷物中的磷，大部分存在于植酸和植酸盐中，这种形式的磷不能或很少被单胃动物利用，同时，植酸和植酸盐还是影响动物体内微量元素消化利用的螯合剂，严重影响二价阳离子矿质元素的利用，最终导致饲料成本增加、磷源浪费和环境污染。在饲料中添加植酸酶，可将植酸和植酸盐水解成肌醇和磷酸盐，供动物吸收利用，从而提高磷的利用率和骨骼矿化程度，减少饲料中磷源的添加和粪便中磷的排出，减少环境污染。产生植酸酶的微生物主要是酵母菌、霉菌和细菌，芽胞杆菌植酸酶含量较少。

2. 芽胞杆菌酶的生产

（1）培养基

培养基不同，微生物的比生长速率和酶形成能力也不同，因而在培养基中提供适当而丰富的营养物，是菌体生长和酶大量产生的重要前提。酶制剂生产中所用原料主要包括碳源（包括能迅速利用的单糖、双糖和缓慢利用的淀粉、纤维素等多糖）、氮源（包括豆饼粉、花生饼粕、鱼粉、蚕蛹粉、酵母粉、玉米浆等有机氮源和铵盐、硝酸盐等无机氮源）、无机盐和诱导物，固体发酵往往还要加入一定量利于通风的载体如稻壳、玉米皮等。实践证明，培养基中碳源与氮源的比例即碳氮比（通常用 C/N 表示）就直接影响菌体的生长、繁殖和酶的生成。当 C/N 值过低时，即培养基中氮源过多，造成微生物生长过盛，而碳源供应不足，容易引起菌体衰老和自溶，造成氮源浪费和酶产量下降；如果 C/N 值过高，即氮源不足，微生物生长过慢，一方面容易引起杂菌感染，另一方面由于没有足够量的微生物来产酶，也会造成碳源浪费和酶产量下降。因此，应根据各种微生物的特性，恰当地选择适宜的 C/N 值，这是提高酶产量的重要措施。各种无机盐类和微量元素如磷、硫、镁、铁、钾、钠、钙、锌、锰等，是微生物细胞结构的重要成分或酶的组成成分，维持酶的活性，能促进微生物生长、发育，刺激酶的生成，培养基中不可或缺。对于含复杂成分的培养基来说，原料和水中往往已含有足够量的无机元素，

一般不需另外添加。但不同菌种的需要量不同，应通过实验来研究确定。饲料工业所用微生物酶大都属于诱导酶类，因此向培养基中加入诱导物就会增加胞外酶的产量。例如，加入槐糖能诱导木霉菌的纤维素酶的生成，木糖诱导半纤维素酶的生成。但诱导物价格往往比较昂贵，实际生产中一般加入廉价的含有诱导物的原料来代替，如槐豆荚等某些植物的种皮中含有槐糖，玉米芯富含木聚糖，培养过程中可陆续被水解产生槐糖、木糖。

（2）产酶要求

生产酶制剂所用菌种要能利用比较廉价和简单的原料，且食性越广越好，在不需添加诱导剂的条件下容易生长，且生长迅速；产生的酶容易分离纯化和浓缩，酶活性要高，稳定性要好，活性谱要宽；产酶微生物应具有稳定的生理特性，而且不形成有毒或致免疫的代谢物。特别要说明的是，产酶菌种除公认是安全菌株外，都要进行毒性实验。

（3）发酵生产

微生物酶的发酵生产，目前主要采用液体深层发酵和固体发酵两种方式。与其他培养方式相比，液体深层发酵具有如下优点：①液体悬浮状态是许多微生物的最适生长环境；②在液态环境中，菌体、底物、产物易于扩散，使发酵在均质或拟均质条件下进行，便于检测、控制，易扩大生产规模；③液体输送方便，易于机械化操作；④产品易于提取精制。与液体发酵相比，固体发酵具有如下缺点：①生产工艺主要限于耐低水活性的菌中；②微生物生长速度较慢，产物有限；③大规模操作时，产生的代谢热较难散去，生产过程中固态发酵参数难以准确测定，难以实现操作的机械化及控制的自动化；④生化反应器的设计还不完善，传统的发酵方式易染杂菌。但是，固体发酵也具有很多液体发酵所不具备的优点，主要表现为：①培养基简单，多为便宜的天然基质；②基质的低含水量可大大减少生化反应器的体积，不需要废水处理，较少污染环境，常不需要严格的无菌操作，后处理加工方便；③不一定连续通风，一般可由间歇通风或气体扩散完成；④产物的产率可较高；⑤设备简单，投资小，能耗低。

由于饲料工业附加值低，饲料用酶无需精制，因此，采用固态发酵更为合适。国内复合酶制剂的生产一般采用固态发酵，液态发酵主要用于植酸酶的生产或生产单酶制剂用于复配合酶制剂。微生物酶的发酵生产是由微生物的生化活动和环境条件相互作用完成的。在发酵生产中，只有环境条件能够被直接调节和控制。除培养基成分及其浓度外，接种量、温度、pH、溶解氧等环境变量也都能影响微生物的代谢活动，在固态发酵中，发酵空间的空气湿度及物料含水量也严重影响菌种的代谢活动和产酶量。菌种不同，生产酶制剂所需工艺条件也不同，其最佳工艺参数必须通过实验来确定。只有为培养物提供一个最适的环境，菌体的代谢活动才能得到最充分的表达，酶产量才高。

（4）酶的提取

在发酵基质中，酶都与大量的其他物质共同存在，而且酶的含量比其他物质要少得多，因此工业用酶需从大量的其他物质中将酶分离出来。但饲料用酶无需纯酶，且发酵所用基质及菌体在生长过程中所产生的氨基酸、维生素、核苷酸、促生长因子等成分对畜禽生长都是有利的，因此饲料用酶无需精制，只要将发酵基质进行浓缩（对液态发酵来讲）、干燥获得粗酶制品即可。

（5）酶的保藏

酶是生物活性物质，酸、碱、有机溶剂、重金属、表面活性剂、高温、紫外线等一些理化因素易引起酶结构发生变化，造成酶的失活，保藏时应注意避免这些不利因素。对于酶的保藏，要保持酶长期不失活，关键要控制好水分和温度两个条件。一般含水量高时酶易失活，含水量超过 10%，在室温或低温下均易失活；含水量降至 5%时，在室温或低温下较稳定，温度越高，越易失活。因此最好在低温下保存酶制品，特别是酶制品含水分较高时，更宜于低温保存。日光照射有时也引起某些酶的失活，因此酶应避免日光直射。一些重金属离子（如铜、铁、铅、汞、银等）会抑制酶的活力，甚至会使酶失活，应尽量避免与这些物质接触。酶的底物和某些物质具有保存酶的作用，因此酶储存时应根据酶的不同特性添加酶的稳定剂或进行包被处理，以使酶长期保存不失活。

二、芽胞杆菌脱氢酶类研究进展

1. 芽胞杆菌脱氢酶分类

脱氢氧化酶类依据其反应受氢体或氧化产物不同，又可以分为 3 种：①氧化酶类（oxidases）。氧化酶直接作用于底物，以氧作为受氢体或受电子体，生成产物水。氧化酶均为结合蛋白质，辅基常含有 Cu^{2+}，如细胞色素氧化酶、酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶等。②需氧脱氢酶类（aerobic dehydrogenases）。需氧脱氢酶以 FAD 或 FMN 为辅基，以氧为直接受氢体，产物为 H_2O_2 或超氧离子，某些色素如甲基蓝（methylene blue，MB）、铁氰化钾[$K_3Fe(CN)_6$]、二氯酚靛酚可以作为这类酶的受氢体。例如，D-氨基酸氧化酶（辅基 FAD）、L-氨基酸氧化酶（辅基 FMN）、黄嘌呤氧化酶（辅基 FAD）、醛脱氢酶（辅基 FAD）、单胺氧化酶（辅基 FAD）、二胺氧化酶等均为需氧脱氢酶类。粒细胞中 NADH 氧化酶和 NADPH 氧化酶也是需氧脱氢酶，它们催化下述反应：超氧离子在超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）催化下生成 H_2O_2 与 O_2。③不需氧脱氢酶类（anaerobic dehydrogenases）。这是主要的脱氢酶类，其直接受氢体不是 O_2，而只能是某些辅酶（NAD^+、$NADP^+$）或辅基（FAD、FMN），辅酶或辅基还原后又将氢原子传递至线粒体氧化呼吸链，最后将电子传给氧生成水，在此过程中释放出来的能量使 ADP 磷酸化生成 ATP，如三磷酸甘油醛脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、细胞色素体系等。

2. 芽胞杆菌脱氢酶研究

（1）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

纳豆芽胞杆菌谷氨酸脱氢酶（GDH）是纳豆发酵产氨的关键酶。以纳豆芽胞杆菌基因组 DNA 为模板，根据枯草芽胞杆菌的 GDH 编码基因（*ROCG*）序列设计引物，进行 PCR 扩增，再经 pMD19-T 质粒 TA 克隆，获得了全长为 1275bp、与 *ROCG* 基因同源性为 98%的纳豆芽胞杆菌 GDH 的编码基因。构建原核表达载体 pET28a-GDH，转化至 *E.coli* BL21（DE3）进行体外诱导表达。表达的包涵体在超声破菌、变性、纯化和复性后，经 SDS-PAGE 分析得到了 47kDa 的特异条带。纳豆芽胞杆菌 GDH 同时具有 NAD^+和 $NADP^+$依赖活性，酶活分别为 6.7723U/mg 蛋白质和 9.4205U/mg 蛋白质（陈丽丽等，2010）。

利用带有 P43 启动子的表达分泌载体 pWB980，实现了简单节杆菌 3-甾酮-1-脱氢酶在枯草芽胞杆菌中的表达，表达出的目的蛋白质的分子质量为 55kDa。利用分光光度法检测得到胞内和胞外可溶性部分的酶活分别为每毫克蛋白质（110±0.5）mU 和（15±0.6）mU，比初发菌株简单节杆菌提高了将近 30 倍。重组芽胞杆菌对甾体底物 4-AD（4-烯-雄甾-3,17-双酮）的转化率为 45.3%，比初发菌株简单节杆菌提高了近 10 倍。利用枯草芽胞杆菌对甾体底物进行脱氢为甾体药物的生产开辟了一条新的途径（李玉等，2006）。以紫色非硫光合细菌、枯草芽胞杆菌为材料，改进了 TTC-脱氢酶活性的测定方法，在该法中样品不需处理，在常温下用三氯甲烷代替丙酮萃取，液-液分层效果好，显色稳定但不褪色。对测定中的诸多影响因素也进行研究，确定了改进后的脱氢酶活性测定的最佳条件（牛志卿和刘建荣，1994）。采用 DEAE-Sepharose 离子交换层析、Blue-Sepharose CL-6B 特异结合层析和 Sephadex G-200 凝胶过滤技术，对枯草芽胞杆菌中的 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶进行了分离纯化，纯化倍数为 112.3 倍，比活为 1.46U/mg，回收率为 8.2%，纯化酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳检验为单一带，测得全酶分子质量为 107kDa，具有两个分子质量相同的亚基，亚基分子质量为 51kDa，最适 pH 为 8.0，最适温度为 30℃，对热不稳定，以 6-磷酸葡萄糖酸和 $NADP^+$为底物，其 K_m 值分别为 K_{m1}（$NADP^+$）=19.8μmol/L 和 K_{m2}（6-GPA）=22.6μmol/L，在 5～50mmol/L 浓度时，Mg^+、Ca^{2+}和 Mn^{2+}对酶有激活作用，Fe^{3+}和 Cu^{2+}对酶有抑制作用，K^+、Na^+、Cl^-，NO_3^-，SO_4^{2-}对酶几乎没有影响，用 PMSF、TNBS、NBS、DTT 和 BrAc 对酶进行修饰，实验结果表明，丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸和组氨酸残基可能是该酶活性中心的功能基团（秦岭等，2003）。枯草芽胞杆菌通过超声破壁、$(NH_4)_2SO_4$ 分段盐析、DEAE-Sepharose FF 离子交换层析，Blue-Sepharose CL-6B 亲和层析、Sephadex G-200 凝胶过滤等纯化步骤，分离出 6-磷酸葡萄糖脱氢酶。经 PAGE 和 SDS-PAGE 检测为单一蛋白质区带，比活 1.7375IU/mg，纯化倍数 72.7，收率 13.6%。凝胶过滤法测定表观分子质量 220kDa，SDS-PAGE 测定亚基分子质量 50.5kDa，可见该酶是由 4 个相同亚基构成的四聚体。测定最适 pH、温度分别为 8.5、37℃，底物 G-6-P 的 K_m 值 0.177mmol/L。考察了部分金属离子及 EDPA 对该酶活性、紫外强度、荧光光谱的影响（莫宏春等，2003；朱文淼和肖敏，1996）。采用弱阴离子树脂 DEAE-52 和蓝色琼脂糖凝胶 FF 层析对枯草芽胞杆菌产生的胞外二氢硫辛酰胺脱氢酶的粗酶液进行两步纯化，得到电泳纯的二氢硫辛酰胺脱氢酶，纯化倍数为 59.7，收率为 46.9%。通过 SDS-PAGE 法测得其亚基分子质量为 64.6ku，Superdex 75 法测得其分子质量为 67.5ku，表明枯草芽胞杆菌 WY34 产胞外二氢硫辛酰胺脱氢酶为单亚基蛋白质。本研究采用的二氢硫辛酰胺脱氢酶的纯化方法，简便且收率较高（武爱民等，2008）。运用分子生物学手段获得葡萄糖脱氢酶基因，并表达该基因。根据枯草芽胞杆菌葡萄糖脱氢酶基因序列设计引物，通过 PCR 获得该基因并与原序列进行比较分析，与表达载体 pET22b 连接后转化至大肠杆菌 JM109（DE3）进行表达，并在全自动生化分析仪上用速率法测定其活性。克隆到的 GDH 编码的氨基酸序列 167 位左右存在突变：EVI（GAAGTGATT）→AF（GCGTTT）。利用酶的初提液测定的葡萄糖脱氢酶活性为 75U/L，比活性为 10U/mg。运用基因工程手段获得了葡萄糖脱氢酶基因，与表达载体连接后的重组体经大肠杆菌初步表达有活力，经诱导有望获得高产量的葡萄糖脱氢酶（周丽萍等，2004）。根据 Lampel

报道的葡萄糖脱氢酶基因序列设计合成两条引物，以野生型枯草芽胞杆菌染色体 DNA 为模板，PCR 扩增得到含有葡萄糖脱氢酶基因大约 780bp 的 DNA 片段，将其克隆到 pUC-T 载体中。序列分析表明，克隆得到的葡萄糖脱氢酶基因含有 783bp，编码 261 个氨基酸。编码氨基酸序列的同源性为 83.9%（乔建军和杜连祥，2001）。利用 PCR 技术扩增得到来源于枯草芽胞杆菌的葡萄糖脱氢酶基因的片段，并构建重组质粒 pUC-T-GDH，然后将基因片段克隆于大肠杆菌表达载体 pBV220 中，得到表达质粒 pBV-GDH。葡萄糖脱氢酶在含有表达质粒的基因工程菌株中得以诱导表达，聚丙烯酰胺凝胶电泳及薄层扫描、葡萄糖脱氢酶活性测试表明基因工程菌株无细胞抽提液中葡萄糖脱氢酶的活力为 7.8U/mg，约为对照组的 30 倍。实验结果初步说明，广泛应用于工业化生产的葡萄糖脱氢酶可以在基因工程菌株中得以大量表达并维持较高活力（乔建军等，2004）。

鱼精蛋白是一种多聚阳离子天然肽类，它是一种碱性蛋白质，具有广谱抑菌活性。通过鲤鱼精蛋白对枯草芽胞杆菌生长的影响及对黑曲霉胞内的琥珀酸脱氢酶（SDH）和苹果酸脱氢酶（MDH）活性影响的研究，探讨鲤鱼精蛋白的抑菌机理。实验结果表明：鲤鱼精蛋白对枯草芽胞杆菌具有较强的抑制作用，但对枯草芽胞杆菌细胞壁不产生破坏作用；对黑曲霉胞内的琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的活性具有明显的抑制作用（杨武英等，2005）。建立葡萄糖脱氢酶连续监测法，优化其检测条件。按酶连续监测法测定要求，对克隆的枯草芽胞杆菌葡萄糖脱氢酶表达酶液进行测定，确定反应体系的底物浓度、最适 pH、反应温度、延滞时间、测定时间、检测范围等。以葡萄糖和 NAD^+为底物时，用连续监测法检测葡萄糖和 NAD^+的终浓度分别为 100mmol/L 和 2mmol/L 时，在反应 pH7.4、37℃、延滞时间 30s、测定时间 60s 等条件下，检测上限可达 10 000U/L。连续监测法能用于测定葡萄糖脱氢酶，快速简便，结果可靠（姜旭淦等，2004）。研究热休克蛋白对增强枯草芽胞杆菌的抗逆性和增加乙醇产量的影响。运用基因工程技术，用大肠杆菌的 Lac 启动子、运动发酵单胞菌丙酮酸脱羧酶基因（*pdc*）和乙醇脱氢酶基因（*adhB*），构建在枯草芽胞杆菌中表达的 BLAP 操纵子，BLAP 操纵子导入枯草芽胞杆菌可使其发酵糖生产小分子热休克蛋白基因（*sHsp*），构建在枯草芽胞杆菌中表达的 BLAPH 操纵子。成功地构建了能表达小分子热休克蛋白，产生乙醇的枯草芽胞杆菌。小分子热休克蛋白的表达，使枯草芽胞杆菌在致死温度下的存活率显著提高，对温度及乙醇的耐受性显著增强。同时枯草芽胞杆菌的乙醇产量显著提高（李伟丽等，2008）。通过筛选食品和土壤等样品中的芽胞杆菌，分离纯化得到菌株 136 株菌株，经过培养和镜检，再筛选到 12 株菌株，比较其产乳酸脱氢酶的活力，其中菌株 BJ07 活力最强，其细胞破碎液的酶比活为 0.26U/mg。经过形态和生理生化鉴定，初步确定菌株 BJ07 为枯草芽胞杆菌（吴新宇和董英，2010）。将简单节杆菌 3-甾酮-1-脱氢酶基因克隆到分泌表达载体 pWB980 上，并转入枯草芽胞杆菌 WB600 中，得到重组芽胞杆菌。重组芽胞杆菌表达出的目的蛋白的分子质量为 55kDa，分光光度法检测到胞内和胞外可溶性部分的酶活分别为（110±0.5）mU 和（15±0.6）mU 蛋白质，对甾体底物 4-AD 的转化率为 45.3%，比出发菌简单节杆菌提高了将近 10 倍（李玉等，2006）。

（2）短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）

芽胞杆菌产 D-葡萄糖脱氢酶的研究。发酵液离心洗涤得菌体，采用超声波破碎（在

40kW 下，工作 4s，间歇 4s，破碎 90 次）制备无细胞抽提液。取无细胞抽提液 80μl 及 100μmol/L 葡萄糖、4μmol/L NADP、0.6mmol/L Tris-HCl（pH6.8）、10μmol/L $MnSO_4$ 溶液各 1ml，在 37℃条件下保温 10min，测定 A_{340} 的值，对比 NADPH 标准曲线，测定 D-葡萄糖脱氢酶的酶含量。根据测定的时间及酶蛋白的含量，从而确定 D-葡萄糖脱氢酶酶活性的测定方法（张锦芳和籍小涛，2001）。

（3）巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）

在维生素 C（VC）两步混菌发酵中，巨大芽胞杆菌可显著促进氧化葡萄糖酸杆菌产 VC 前体 2-酮基-L-古龙酸（2-KLG）。采用硫酸铵分级盐析沉淀、柱层析及电泳技术对巨大芽胞杆菌胞外液中的活性物质进行了分离纯化。通过测定氧化葡萄糖酸杆菌生长细胞转化 L-山梨糖为 2-KLG 的生成量、山梨糖脱氢酶（SDH）酶活性及产酸菌的活菌数，研究了 VC 两步发酵中不同胞外组分大菌对小菌的作用。结果表明：大菌胞外 36 000 和 44 300 两个组分蛋白质对小菌产酸、SDH 酶活具有促进作用（吕淑霞等，2011）。目的：运用聚合酶链反应技术从巨大芽胞杆菌中获得葡萄糖脱氢酶基因，并表达该基因。方法：根据巨大芽胞杆菌葡萄糖脱氢酶基因两端序列设计引物，通过 PCR 获得该基因，与表达载体 pET22b 连接后转化至大肠杆菌 JM109（DE3）进行诱导表达。结果：重组基因表达产物经 SDS-PAGE 鉴定显示，比活力为 10U/mg。结论：运用基因工程手段获得了葡萄糖脱氢酶基因，经诱导获得了较高产量的葡萄糖脱氢酶（周丽萍和徐军，2007；龚家玮和朱春宝，2004）。

（4）嗜碱芽胞杆菌（*B. halodurans*）

用 LB 培养基培养转化重组嗜碱芽胞杆菌 XJU-1 乙醛脱氢酶 *aldA* 基因的工程菌菌株 BL21（DE3），提取粗酶液，然后利用 SDS-PAGE 考察重组蛋白质 ALDH 的表达量和分子质量，测定其活性，并对表达产物的最适 pH、最适温度、金属离子的影响和 K_m 值进行研究。结果表明，工程菌菌株 BL21（DE3）表达的蛋白质 ALDH 量明显高于对照菌，亚基分子质量约为 56kDa；乙醛脱氢酶活性比对照菌增加了 24 倍；最适反应温度为 20～40℃，最适 pH 为 9.0～9.5，K^+和 Na^+对酶有激活作用，而 Mn^{2+}、Mg^{2+}对酶有抑制作用；K_m 值为 1.73mmol/L。说明重组嗜碱芽胞杆菌 XJU-1 乙醛脱氢酶 *aldA* 基因在工程菌菌株 BL21（DE3）中能够高效表达（赵绪光等，2010）。

（5）嗜热芽胞杆菌（*B. thermophilus*）

彭益强等（2007）通过产甘油脱氢酶（GDH）的驯化培养与复筛，获得 GDH 酶活达 0.201U/ml 的嗜热芽胞杆菌属菌株 TB8-5；进一步研究发现，该菌株发酵液中的主要产物组分为 1,3-二羟基丙酮（Dihydroxyacetone），含量为 0.597mg/ml，GDH 酶活也最高，其最适反应温度为 50℃，Zn^{2+}对酶活有一定的促进作用。

（6）苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）

在苏云金芽胞杆菌生长和芽胞形成过程中，氮素的吸收、同化和运输等代谢状况直接影响着产量的形成。立足于苏云金芽胞杆菌氮代谢途径，探讨苏云金芽胞杆菌对氮素吸收、还原、同化和分配的特征（张健和张琳，2011）。根据 Bcl4579 丙酮酸脱氢酶基因序列设计引物，从苏云金芽胞杆菌 BMB171 总 DNA 中扩增得到相应的丙酮酸脱氢酶基因 DNA 片段。将 DNA 片段装载到大肠杆菌构建 pET-E1 表达系统，再通过优化重组

菌的表达条件获得有生物活性的丙酮酸脱氢酶。结果表明，pET-E1 表达系统构建获得成功；优化的表达条件如下：培养基为 TB＋M9（体积比 1∶1）、起始菌体密度 OD_{600} 为 4～5.5、诱导剂 IPTG 浓度为 0.04mmol/L（杨迪等，2009）。

三、芽胞杆菌脱羧酶类研究进展

通过氨基酸脱羧酶作用，生成有机胺和二氧化碳。有机胺在胺氧化酶作用下放出氨生成相应的醛，醛再氧化成有机酸，最后按脂肪酸 β-氧化的方式分解。氨基酸脱羧酶具有高度的专一性，基本上是一种氨基酸有一种脱羧酶来催化它的分解。反应中放出的二氧化碳可以用微量测压计测定，因此可根据一定基质在一定时间内被单位细胞作用后，产生二氧化碳的量来测定脱羧酶的酶活。另外，也可以分析样品中的氨基酸的含量。

从不同土壤中分离出 124 株芽胞杆菌，经过用不同发酵培养基和啤酒中双乙酰降低试验反复筛选，得到一株初产 α-乙酰乳酸脱羧酶活性较高的地衣芽胞杆菌 H6（*B. licheniformis* H6），认为该菌株所产酶对啤酒生产有应用价值（黄建新和周欣，2000）。以从土壤中分离出的 9 株地衣芽胞杆菌菌株，通过产酶实验发现菌株 BL-4 的产酶活性最好，通过 UV 和 NTC 对菌株 BL-4 进行复合诱变，获得了一株产酶活性比初发菌株 BL-4 高 1.22 倍的 α-乙酰乳酸脱羧酶高产菌株，并研究了该菌株的最佳发酵产酶条件：培养温度 30℃，发酵时间 36h，发酵液起始 pH6.5（周文斌，2002）。

地衣芽胞杆菌 AS10106 α-乙酰乳酸脱酸酶经硫酸沉淀、聚乙二醇沉淀、DEAE-Sepharose 离子交换、Gigapite K-100S 柱层及 Sephadex G-100 分子凝胶过滤柱等分离纯化步骤，得到 SDS-PAGE 纯 α-乙酰乳酸脱羧酶的比活提高了 53.5 倍。对该酶性质的研究表明，酶单亚基分子质量为 32kDa、等电点为 4.5；该酶的最适反应温度为 40℃，最适反应 pH 为 6.0，对 40℃以上热敏感。在 pH5.0～6.5 时稳定。酶活不需要金属阳离子，Cu^{2+}、Co^{2+}强烈抑制酶的活性。摇瓶实验表明，纯化的地衣芽胞杆菌 α-乙酰乳酸脱羧酶能明显降低双乙酰的形成并缩短其还原时间（郑华军等，2002）。采用离子注入技术对一株产 α-乙酰乳酸脱羧酶的地衣芽胞杆菌 BL391 进行诱变处理，结果表明，在 N^+ 注入剂量为 $50×10^{14}/cm^2$ 时，诱变效果较好，从正变菌株中反复筛选到一株产酶量高的菌株 HL115，比初始菌株的酶活提高了 40%左右，经过连续传代实验，其遗传性状稳定（惠友权等，2001）。

四、芽胞杆菌超氧化物歧化酶研究进展

1. 超氧化物歧化酶的发现

SOD 是 superoxide dimutese 缩写，中文名称为超氧化物歧化酶，是 1969 年美国 Dude 大学 Fridovich 教授和他的研究生 McCoard 发现的。它是生物体内重要的抗氧化酶，广泛分布于各种生物体内，如动物、植物、微生物等。SOD 具有特殊的生理活性，是生物体内清除自由基的首要物质。SOD 在生物体内的水平高低意味着衰老与死亡的直观指标；现已证实，由氧自由基引发的疾病达 60 多种。它可对抗与阻断氧自由基对细胞造成的损害，并及时修复受损细胞，复原自由基对细胞造成的伤害。由于现代生活压力、环境污

染、各种辐射和超量运动都会造成氧自由基大量形成，因此生物抗氧化机制中 SOD 的地位越来越重要。

2. 超氧化物歧化酶结构分析

自 1956 年 Perutz 和 Kendrew 解析肌红蛋白及血红蛋白晶体结构以来，至今已阐明了上百个蛋白质晶体的结构和几个 tRNA 结构。蛋白质晶体学已作为一门边缘学科而确立，随着科学技术的发展和实验技术的不断完善，科学工作者通过各种手段能够获得生物大分子的基本结构信息，并可进一步获得有关作用机理、调节原理的信息，为设计各种生物实验提供坚实的基础。

3. 超氧化物歧化酶的功能

自从 Mann 和 Keilin 于 1938 年首次从牛红细胞中分离出一种蓝色铜蛋白（最初定名为血铜蛋白），并由 McCord 和 Fridovich 于 1969 年根据其酶活特性定名为超氧化物歧化酶以来，人们对它的研究不断深入。近年来的研究表明，SOD 在维持生物体内超氧阴离子自由基的产生与消除的动态平衡中起重要作用，它能防御氧毒性，增强机体抗辐射损伤能力，还可预防衰老，在一些疾病如肿瘤、炎症及自身免疫疾病等的治疗中有良好的疗效。目前国内对 SOD 的研究主要集中在应用及与应用直接相关的基础理论的研究上。SOD 已进入化妆品、食品、医药等领域，无可置疑，SOD 的应用与开发将有不可估量的前景。SOD 按其结合的金属离子，可分为 Fe-SOD、Mn-SOD、CuZn-SOD 3 种，前两种性质相似，在蛋白质一级结构、空间结构、分子质量、光谱性质及对不同抑制剂的敏感等方面与后者差别较大。早些时候认为 Fe-SOD 主要存在于原核细胞中，随实验手段的改进，现已在枸杞、何首乌等越来越多的维管植物中发现 Fe-SOD 的存在。Mn-SOD 在原核细胞和真核细胞中都存在。CuZn-SOD 主要存在于真核细胞中，由此引出进化方面的研究。一般认为 Fe-SOD、Mn-SOD 很早起源于一个共同的祖先——光合细菌，而 CuZn-SOD 是在以后的发展中单独进化而成。

探讨了超氧化物歧化酶（SOD）等自由基清除剂对苏云金芽胞杆菌紫外辐射的影响。结果表明，SOD、绞股蓝皂苷等自由基清除剂能够明显提高紫外辐射损伤细胞的存活率，并且 SOD 的保护作用表现为防护与恢复两种不同的作用。又通过细胞电泳与琼脂糖凝胶电泳发现，紫外辐射后其细胞膜及质粒 DNA 均受到了明显的防护；SOD 对细胞膜损伤有一定的恢复作用，而对 DNA 不表现恢复效应。由此认为，紫外线对细胞膜及 DNA 均有损伤，SOD 恢复作用的主要部位在细胞膜而不是 DNA 分子。为进一步确定 SOD 的作用及利用自由基清除剂制备高效的 Bt 农药提供了理论基础（黎媛等，2003）。

4. 超氧化物歧化酶检测方法

SOD 的催化底物是 O_2，一般多以一定时间内产物生成量或底物的消耗量作为酶活性单位。由于 O_2 自身很不稳定，且不易制备，测定 SOD 的方法除少数采用直接法外，一般多为间接法。

（1）直接法原理是根据 O_2 或产生 O_2 的物质本身的性质测定 O_2 的歧化量，从而确

定 SOD 的活性。经典的直接法包括：脉冲辐射分解法、电子顺磁共振波法、核磁共振法。由于所需的仪器设备价格昂贵，一般较少应用。

（2）一般化学法的共同特点是要有一个 O_2 的产生体系和一个被 O_2 还原或氧化的可检测体系。在 SOD 存在下，一部分 O_2 被 SOD 歧化，因而 O_2 还原或氧化检测体系的反应受到抑制。根据反应受抑制程度，测定 SOD 的活性。一般化学法有邻苯三酚自氧化法、细胞色素 c 还原法、羟胺法、黄嘌呤氧化酶-NBT 法、肾上腺素法、没食子酸法、6-羟多巴胺法、亚硝酸盐形成法和碱性二甲亚砜法。常用的有：①邻苯三酚自氧化法，即改良 Marklund 法。原理是基于经典的分光光度法，在碱性条件下，邻苯三酚自氧化成红橘酚，用紫外-可见光谱跟踪波长为 325nm、420nm 或 650nm（经典为 420nm），同时产生 O_2，SOD 催化 O_2 发生歧化反应从而抑制邻苯三酚的自氧化，样品对邻苯三酚自氧化速率的抑制率，可反映样品中的 SOD 含量。本法具有特异性强、所需样本量少（仅 50μl）、操作快速简单、重复性好、灵敏度高、试剂简单等优点。②细胞色素 c 还原法（McCord 法），原理是黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系中产生的 O_2 使一定量的氧化型细胞色素 c 还原为还原型细胞色素 c，后者在 550nm 有最大光吸收。在 SOD 存在时，由于一部分 O_2 被 SOD 催化而歧化，O_2 还原细胞色素 c 的反应速度相应减少，即其反应受到抑制。将抑制反应的百分数与 SOD 浓度作图可得到抑制曲线，由此计算样品中 SOD 的活性。本法是间接法中的经典方法，但本法灵敏度较低。

（3）化学发光法原理是黄嘌呤氧化酶在有氧条件下，催化底物黄嘌呤或次黄嘌呤发生氧化反应，生成尿酸，同时产生 O_2。后者可与化学发光剂鲁米诺反应，使其产生激发。SOD 能清除 O_2 从而抑制鲁米诺的化学发光。本法可应用于 SOD 的微量测定，不仅灵敏度高，简便易行，而且特异性与准确性至少与细胞色素 c 还原法类似。

（4）上述方法测定的是 SOD 活性，免疫学方法则可测定样品中 SOD 的质量，因此特异性较好，是较理想的测定 SOD 的方法，免疫法有放射免疫法、化学发光免疫分析法、ELISA 法等。但其缺陷是只能测定抗体相应的抗原，对于检测不同种类的 SOD，则必须制备相应的特异性抗体，手续烦琐。

（5）电泳染色定位法的基本原理是根据光化学法与 NBT 还原法。电泳则采取垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳，既可采用 SOD 活性正染色（呈现棕色区带），也可采取 SOD 活性负染色（呈现无色透明区带）。根据凝胶电泳上分离的 SOD 区带的着色深浅与面积大小，对样品进行半定量分析，也可制作校正曲线计算样品中的 SOD 含量。染色定位法常用于鉴定 SOD，很少为了定量，主要原因是它不及化学法简便，但鉴定 SOD 较化学法好。用电泳法可鉴定 SOD 是否掺有杂质蛋白，有无同工酶，且可半定量地确定 SOD 的活性大小。

5. 产超氧化物歧化酶芽胞杆菌培养特性

研究了蜡状芽胞杆菌生产菌株 C328 SOD 在发酵培养过程中培养基种类、碳氮比及补充碳氮源对产酶的影响。结果表明，菌株 C328 发酵产酶率与培养基种类、复配碳氮比有密切关系，培养基浓度为 10%时，对菌株生长及产酶有明显的促进作用，超过 13%则抑制 SOD 酶产生。筛选出最佳产酶发酵农副产品培养基和优化配比组合产酶培养基

（丁学知和高必达，2003）。枯草芽胞杆菌 314 是超氧化物歧化酶（SOD）的产生菌，经过我国“92106”科学返回式卫星搭载之后，生长速度加快，酶活性提高 2 倍以上（贾士芳等，1995）。蜡状芽胞杆菌经培养后，离心收集菌体，将其破碎、离心，经 $(NH_4)_2SO_4$ 分级沉淀、Sephadex G-75 凝胶过滤和 DEAE-52 柱层析所获得的超氧化物歧化酶进行 SDS-PAGE 为一条带，亚基分子质量为 17 783Da，表明制备得到了电泳纯品。将该样品经氰化钾、双氧水、氯仿-乙醇抑制实验和特征吸收光谱分析，鉴定出此酶为 Fe-SOD，比活为 1753.8U（苏宁等，1998）。

对从蜡状芽胞杆菌发酵菌体中纯化的 Fe-SOD 进行了理化性质研究，测定结果表明：在 27℃、pH6.8、光照强度为 4000lx 条件下，光照 20min 为酶活性测定的最佳条件，经 SDS-PAGE 分析得其亚基分子质量为 17 783Da，等聚焦电泳表明：Fe-SOD 的等电点（pI）大约为 6.5；经 DNS 法分析 N 端氨基酸为谷氨酸（Glu），其氨基酸的组成中酸性氨基酸的含量大于碱性氨基酸的含量（苏宁等，1999）。采用化学动力学方法首次测定了蜡状芽胞杆菌 SOD 稳定性，结果表明，蜡状芽胞杆菌 SOD 的 $t_{0.9}$ 为 55.97/min，$t_{1/2}$ 为 369.40min，显示该酶具有良好的稳定性，提示可作为一种 SOD 药用酶的重要资源，具有潜在的重要药用价值（夏立秋等，1996）。研究了球形赖氨酸芽胞杆菌菌株 C3-41 超氧化物歧化酶的产生条件和部分特性（郑滔和刘娥，1998）。研究了从芽胞杆菌中提取的 Fe-SOD 纯酶的热和 pH 稳定性。结果表明，在 25℃、35℃条件下保温 20～95min，酶活略增高，45℃保温 50min 和 80min 其酶活分别为原酶的 81.0%和 70.0%；pH 为 6～10 时酶活稳定（周国庆等，1999；王忠彦等，1997）。

五、芽胞杆菌纤维素酶研究进展

1. 纤维素酶的组成、结构及作用机制

纤维素酶（cellulase）是一种高活性生物催化剂，是由多种可降解纤维素生成葡萄糖的多组分酶的复杂酶系，因此又有纤维素酶复合物之称。传统上将其分为 3 类。

（1）内切 β-1,4-葡聚糖酶（endo-1,4-β-D-glucanase，EC3.2.1.4，简称 EG 或 Cx 纤维素酶），Cx 酶又分为 Cx1 酶和 Cx2 酶，Cx1 酶是一种内断型纤维素酶，作用于纤维素分子内部的非结晶区，从高分子聚合物内部任意切开 β-1,4-糖苷键，产生带非还原性末端的小分子纤维素，而 Cx2 酶是一种外断型纤维素酶，它从水结合性纤维素分子的非还原端作用于 β-1,4-糖苷键生成葡萄糖。

（2）外切 β-1,4-葡聚糖酶（exo-1,4-β-D-glucanase，EC3.2.1.9，简称 CBH 或 C1 纤维素酶），此酶广泛存在于丝状真菌，可降解晶体纤维素，可将短链的非还原性末端纤维二糖残基逐个切下。

（3）β-葡萄糖苷酶（EC3.3.1.21，简称 BG 或纤维二糖酶），此酶广泛存在于微生物中，能将纤维二糖水解成单分子葡萄糖。纤维素酶水解纤维素生成葡萄糖的机理和详细过程至今还不是非常清楚，目前关于 Cx 酶、C1 酶和 β-葡萄糖苷酶 3 种酶的作用机理的假说比较公认的是以下 3 种：协同作用理论（synergism）、原初反应假说（initial degrading）和碎片理论（fragmentation）。其中以协同作用理论最为广泛接受，该理论认为内切葡

萄糖酶首先进攻纤维素的非结晶区，形成外切纤维素酶需要的新的游离末端，然后外切纤维素酶从多糖链的非还原端切下纤维二糖单位，纤维二糖再将其水解成单分子葡萄糖。对纤维素酶一级结构和三级机构的研究发现，大多数纤维素酶都有多个纤维素结合（吸附）结构域（cellulose binding domain，CBD）和催化结构域（catalytic domain，CD）组成，中间由一段连接肽（linker peptide）连接。纤维素酶分子普遍具有类似的结构域，由球状的催化结构域（catalytic domain，CD）、连接桥（linker）和纤维素结合（吸附）结构域（cellulose-binding domain，CBD）3 部分组成（程旭艳等，2012）。

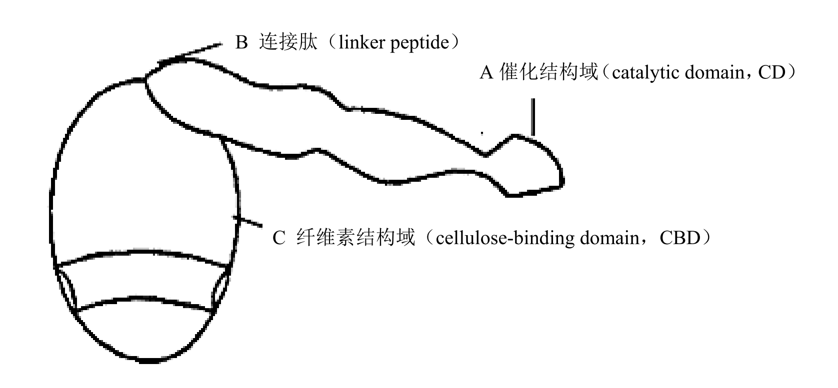


图 2-1　纤维素酶分子结构模型（Meenu *et al.*, 2014）

A. 催化结构域（CD）。它体现酶的催化活性及特定水溶性底物的特异性，Juy 等采用 X 射线衍射方法对 CelD 催化结构域进行了结晶和解析，并对内切酶和外切酶的底物特异性做出解释：内切酶的活性位点位于一个开放的 Cleft 中，可与纤维素链的任何部位结合并切断纤维素链；外切酶的活性位点位于一个长 Loop 形成的 Tunnel 里面，它只能从纤维素链的非还原性末端切下纤维二糖。B. 连接肽（LP）。纤维素连接肽高度糖基化，大多富含脯氨酸和羟脯氨酸，链接 CD 和 CBD 形成较为稳定的聚集体。C. 纤维素结合（吸附）域（CBD）。CBD 执行着调节酶对可溶性和非可溶性底物专一性活力的作用，对酶的催化活力是非常必要的。CBD 的楔形结构可以插入和分开纤维素的结晶区，吸附在纤维素分子链表面，从而提高了底物表面有效酶的浓度，具有疏解纤维素链的作用

2. 纤维素酶的应用

纤维素酶可广泛用于食品、纺织、饲料、环境治理等众多领域。随着石油、粮食危机的到来，利用纤维素酶将纤维素农业废弃物转化为纤维素乙醇的工艺越来越受到各国政府和研究机构的关注和重视。通过利用纤维素酶生物转化技术将农业废弃物（如水稻秸秆、油菜秸秆、花生壳、棉籽壳、甘蔗渣、玉米芯、香蕉秸秆等）、食品加工废弃物（果皮、果渣等）、木材废料及城市含纤维素废弃物等转化为简单的糖类，再发酵产生燃料乙醇等能源物质，这样不仅可以变废为宝，而且可以做到资源的有效利用和可持续开发。朱屋彪等（2008）利用纤维素降解菌对香蕉秸秆进行快速降解并转化为可发酵糖，其水解后葡萄糖产率达 19%，相当于香蕉秸秆中约 42%的纤维素水解并转化为葡萄糖。

3. 产纤维素酶芽胞杆菌的筛选

芽胞杆菌 x-6 经甲基磺酸乙酯（EMS）和紫外线（UV）复合诱变，从其万古霉素抗性突变体中选育获得一株突变株 EV23，所产生的纤维素酶为碱性酶，且酶活性由原来的 0.84U/ml 提高到 3.53U/ml，菌株 EV23 基本上组成性地合成碱性羧甲基纤维素酶（CMCase），酶合成明显表现出抗降解物阻遏的特点，以葡萄糖为碳源培养，4%浓度时酶合成水平达最高，酶合成与生长几乎同时发生，合成效率受菌体生长速率影响较大（王丹敏和宋佳径，1995）。从碱性土样中分离到数十株产碱性β-聚糖酶类的细菌经摇瓶反复筛选后，得到一株碱性β-聚糖酶产量较高的耐碱细菌，经初步鉴定，属短小芽胞杆菌，其纤维素酶作用的最适 pH 为 7.6，最适温度为 60℃，木聚糖酶作用的最适 pH 为 9.0，最适温度为 55℃，该菌的最适生长 pH 为 8.0，最适产酶温度为 28～32℃，木聚糖与山梨糖分别是木聚糖酶和纤维素酶的良好诱导物，以麸皮为碳源，产酶的最适浓度为 5%，添加尿素和（$(NH_4)_2SO_4$）（姜英辉和曲音波，1999）。从我国内蒙古地区天然碱湖样品中分离的 200 余株嗜碱细菌中筛选到一株产生碱性纤维素酶的菌株 N6-27，初步鉴定为芽胞杆菌。产酶的最适碳源为羧甲基纤维素钠（CMC），氮源为复合蛋白胨，Na_2CO_3 浓度为 0.2%，酶反应的最适温度和 pH 分别为 55℃和 8.5，在 50℃条件以下及 pH6.0～11.0 时稳定，主要作用底物为 CMC，对滤纸、纤维素粉和结晶纤维素几乎不作用（田新玉和王欣，1997）。研究了各种碳源、氮源、pH、通风量等工艺条件对嗜耐盐芽胞杆菌 V-5 产酶酶系的影响，通过酶在表面活性剂中的实验，分析不同表面活性剂对酶系中各组分的影响，初步研究酶系与去污力的关系，认为除以内切酶为主外，酶系中另两个组分，在去污效果中的辅助作用不容忽视（田亚平等，1998）。迄今报道的绝大多数纤维素酶的最适 pH 都在酸性和中性范围，当添加到洗涤剂中时，由于处于碱性环境而无活力，不能发挥作用，近年来，国内外对由耐盐芽胞杆菌（*Bacillus* sp.）产生的碱性纤维素酶（CMCase，endo-β-1,4-glucanase，EC3.2.1.4）进行了广泛的研究。对该酶产生菌株的筛选和培养条件、酶学性质，以及该酶基因的克隆和表达等方面的研究进行综述；并对我国目前未能实现该酶工业化的原因进行了初步分析，并提出解决途径（高红亮和杨雪霞，2002）。

六、芽胞杆菌脂肪酶类研究进展

1. 脂肪酶的来源

脂肪酶广泛存在于动植物和微生物中。植物中含脂肪酶较多的是油料作物的种子，如蓖麻籽、油菜子，当油料种子发芽时，脂肪酶能与其他的酶协同发挥作用催化分解油脂类物质生成糖类，提供种子生根发芽所必需的养料和能量；动物体内含脂肪酶较多的是高等动物的胰脏和脂肪组织，在肠液中含有少量的脂肪酶，用于补充胰脂肪酶对脂肪消化的不足，在肉食动物的胃液中含有少量的丁酸甘油酯酶。在动物体内，各类脂肪酶控制着消化、吸收、脂肪重建和脂蛋白代谢等过程；细菌、真菌和酵母中的脂肪酶含量更为丰富（Pandey *et al.*，1999）。由于微生物种类多、繁殖快、易发生遗传变异，具有

比动植物更广的作用 pH、作用温度范围及底物专一性，且微生物来源的脂肪酶一般都是分泌性的胞外酶，主要的发酵微生物有黑曲霉、假丝酵母等，适合于工业化大生产和获得高纯度样品，因此微生物脂肪酶是工业用脂肪酶的重要来源，一般不同来源的脂肪酶特性也不一样，并且在理论研究方面也具有重要的意义。

2. 脂肪酶的性质

脂肪酶是一类具有多种催化能力的酶，可以催化三酰甘油酯及其他一些水不溶性酯类的水解、醇解、酯化、转酯化及酯类的逆向合成反应，除此之外还表现出其他一些酶的活性，如磷脂酶、溶血磷脂酶、胆固醇酯酶、酰肽水解酶活性等（Schmid *et al.*，2005）。脂肪酶不同活性的发挥依赖于反应体系的特点，如在油水界面促进酯水解，而在有机相中可以促进酶促合成和酯交换。脂肪酶的性质研究主要包括最适温度与 pH、温度与 pH 稳定性、底物特异性等几个方面。迄今，已分离、纯化了大量的微生物脂肪酶，并研究了其性质，它们在分子质量、最适 pH、最适温度和热稳定性、等电点和其他生化性质方面存在不同（Huang *et al.*，2004）。总体而言，微生物脂肪酶具有比动植物脂肪酶更广的作用 pH、作用温度范围、高稳定性和活性，对底物有特异性（Schmidt and Bornscheuer，2005；Tuomi and Kazlauskas，1999）。

脂肪酶的催化特性。在油水界面上其催化活力最大，早在 1958 年，Sarda 和 Desnnelv 就发现了这一现象。溶于水的酶作用于不溶于水的底物，反应是在两个彼此分离的完全不同的相的界面上进行。这是脂肪酶区别于酯酶的一个特征。酯酶（EC3.1.1.1）作用的底物是水溶性的，并且其最适底物是由短链脂肪酸（≤C8）形成的酯。

3. 脂肪酶的作用

脂肪酶是重要的工业酶制剂品种之一，可以催化解脂、酯交换、酯合成等反应，广泛应用于油脂加工、食品、医药、日化等工业。不同来源的脂肪酶具有不同的催化特点和催化活力。其中用于有机相合成的具有转酯化或酯化功能的脂肪酶的规模化生产对于酶催化合成精细化学品和手性化合物有重要意义。酶是一种活性蛋白质，因此，一切对蛋白质活性有影响的因素都影响酶的活性。酶与底物作用的活性，受温度、pH、酶液浓度、底物浓度、酶的激活剂或抑制剂等许多因素的影响。脂肪酶在微生物中有广泛的分布，其产生菌主要是霉菌和细菌。已经公布的适用于甘油三酯加工的不同来源的脂肪酶有 33 种，其中 18 种来自霉菌，7 种来自细菌。脂肪酶可将甘油三酯（油、脂）水解，在不同阶段可释放出脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯及甘油。水解生成的脂肪酸，可以用标准的碱溶液滴定，以滴定值表示酶活性。反应式为 $RCOOH+NaOH \rightarrow RCOONa+H_2O$。

4. 脂肪酶的类型

脂肪酶主要有脂肪甘油三酯脂肪酶（ATGL）、激素敏感性脂肪酶（HSL）和单酯脂肪酶，其中 ATGL 只水解 TG，而 HSL 可以水解 TG 和 DG，而 MGL 只水解甘油单酯。脂肪酶主要用于食品行业、造纸行业、皮革行业、饲料行业、医药催化合成、油脂奶酪加工等。

5. 脂肪酶的测定

酶活表述，在一定温度和一定 pH 条件下，水解甘油三酯每分钟生成 1μmol 脂肪酸的酶量，即为一个国际单位，以 U/ml 或者 U/g 表示。①滴定法：酶促反应 4h 为 0.06～0.89U/ml，酶促反应 16～24h 为 0.2～1.5U/ml。②比浊法：呈正偏态分布，最低为 OU，单侧 95%上限为 7.9U。活性测定粗酶液的制备，用电子天平分别称取粗脂肪酶 0.010g、0.020g 和 0.030g，用蒸馏水溶解并定容至 100ml，配成浓度分别为 0.01%、0.02%和 0.03%的粗酶液。实验设计，实验以 10ml 色拉油为底物，以酶用量、水解温度、反应时间为因素，通过酸价的测定选定其水解的最佳条件。酸价的测定，酸价是指中和 1mol 游离脂肪酸所需 NaOH 的毫克数，它用于衡量油脂的水解程度。实验中用酸碱滴定法测定水解液的酸价，向所得的水解液滴加 1ml 95%的乙醇溶液，摇匀，终止反应，并加入 2 滴酚酞指示剂，迅速用 0.05mol/L 的 NaOH 溶液滴定至溶液呈微红色，在 30s 内不消失为终点，记录消耗的 NaOH 溶液毫升数（V）。用同样的方法测定空白值，每个实验重复两次，以平均值作为测定结果。酸价按下式计算：$X=C(V-V_0)\times 40/m$。式中，X 为油脂酸价（mg NaOH/g 油）；C 为 NaOH 标准溶液的浓度（mol/L）；m 为试样的质量（g）；40 为 NaOH 的毫摩尔质量（mg/mmol）。

粗脂肪酶活性的测定。在最佳水解条件下，分别测得粗脂肪酶和标准脂肪酶水解液的酸价 X_1、X_2，根据公式 $U_1/U=X_1/X_2$ 求得粗脂肪酶的活力，式中，U_1 为粗脂肪酶活性；U 为标准脂肪酶活性。标准脂肪酶液的配制，根据实验最佳条件，配制标准脂肪酶液。通过固体平板法从含油脂土样中筛选出一株产碱性脂肪酶活性较高的菌株，鉴定为解淀粉芽胞杆菌。此菌最佳产酶条件为：1%淀粉为碳源，2%黄豆粉和 2%玉米粉为氮源，培养基起始 pH7.0，30℃培养 72h。对发酵液性质进行初步研究发现，此酶最适反应温度为 37℃，最佳反应 pH 为 8.5。0.01mmoL/L Ca^{2+}和 K^{+}对酶有激活作用，而 Cu^{2+}和 Fe^{3+}则对该酶有抑制作用（牛冬云和张义正，2003；朱剑宏等，2000）。从武汉市白沙洲沙鸥食用油总厂分离筛选到一株耐热碱性脂肪酶的产生菌，经鉴定为产芽胞的短杆菌，革兰氏阳性，该菌株的最适生长温度为 45℃，所产酶的最适作用温度为 60℃，最适 pH 为 10.0，且 pH 在 8.0～11.0 时酶蛋白性质稳定（李春华，1999）。

从 16 个土样中分离获得一株脂肪酶产生菌 E-53#，该菌可优先水解 S-（+）-萘普生甲酯为 S-（+）-萘普生，ee 值可超过 87%。该菌经初步鉴定为芽胞杆菌，最佳产酶培养基为葡萄糖 0.5%、蛋白胨 0.5%、酵母膏 0.2%。0.5%的橄榄油能诱导脂肪酶的大量产生（辛嘉英等，2000）。

七、芽胞杆菌果胶酶研究进展

1. 概述

果胶质广泛存在于高等植物中，是植物细胞胞间层和初生壁的重要组成成分，在植物的细胞组织间起“黏合”作用。近几年来，果胶质的生物降解日益引起国内外学者的广泛关注。能够分解果胶质的酶称为果胶酶（pectinase），它广泛存在于各种微生物中，

细菌、真菌和放线菌都能产生相关酶类。果胶酶类的应用领域非常广泛，不仅可用于食品工业如水果加工及葡萄酒生产等方面，还广泛应用于麻类脱胶、木材防腐、生物制浆、环境保护、污物软化处理和饲料等行业中。果胶酶主要分为原果胶酶、聚半乳糖醛酸酶、裂解酶和果胶酯酶等几大类，研究果胶酶各组分的性质，有利于果胶酶的单一酶种的开发利用。同时微生物果胶酶的分子生物学研究将有助于人们更合理地利用果胶酶。

2. 果胶简介

果胶分子是由不同酯化度的半乳糖醛酸以 α-1,4 糖苷键聚合而成的多糖链，常带有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、海藻糖、芹菜糖等组成的侧链，游离的羧基部分或全部与钙离子、钾离子、钠离子，特别是与硼化合物结合在一起（Pérez *et al.*，2003）。它存在于所有的高等植物中，沉积于初生细胞壁和细胞间层，在初生壁中与不同含量的纤维素、半纤维素、木质素的微纤丝及某些伸展蛋白（extensin）相互交联（Pérez *et al.*，2000），使各种细胞组织结构坚硬，表现出固有的形态。果胶分子的结构因植物的种类、组织部位、生长条件等的不同而不同，总体可分为光滑区（smooth region）和须状区（hairy region）两部分，主要由 HGA、RG-Ⅰ和 RG-Ⅱ3 个结构区域构成，其中 RG-Ⅱ常以二聚体的形式存在。同其他植物多糖一样，果胶也是多分子的、多分散的、多结构的、有高级空间构象的，也具有一定的相对分子质量分布。

3. 果胶酶的分类

从广义上讲，果胶酶可以分为 3 种类型：①原果胶酶，可以把不溶于水的原果胶分解为可溶于水的高聚合体果胶；②果胶酯酶，脱去果胶中的甲氧基基团，促使果胶的脱甲酯作用；③解聚酶，促使果胶中 D-半乳糖醛酸的 α-1,4 糖苷键的裂解。近来人们提出了更详细的分类方法（张海燕和吴天祥，2006）。将果胶酶分为原果胶酶（protopectinase）、多聚半乳糖醛酸酶（polygalacturonases）、裂解酶（pectin lyases，PL）和果胶酯酶（pectinesterase，PE）。

根据其作用机理分为两种类型：A 型原果胶酶与 B 型原果胶酶。前者主要作用于原果胶内部的多聚半乳糖醛酸区域，而后者主要作用于外部的连接多聚半乳糖醛酸链和细胞壁组分的多糖链。多聚半乳糖醛酸酶是在有水环境下促进聚半乳糖醛酸链水解的一种果胶酶，应用最为广泛。根据水解作用机理不同，它可以分为内切聚半乳糖醛酸酶（E.C.3.2.1.15）和外切聚半乳糖醛酸酶（E.C.3.2.1.67）。

外切酶又可以划分两种类型：一种是真菌外切聚半乳糖醛酸酶，它的终产物是单体半乳糖醛酸；另一种是细菌外切聚半乳糖醛酸酶，它的终产物是二聚体的半乳糖醛酸。裂解酶（反式消去酶）是通过反式消去作用裂解果胶聚合体的一种果胶酶，裂解酶在 C-4 位置上断开糖苷键，同时从 C-5 处消去一个 H 原子从而产生一个不饱和产物。根据其作用机理及作用底物的不同，裂解酶可以划分为：① 内切聚半乳糖醛酸裂解酶（EndoPGL，E.C.4.2.2.2）；② 外切聚半乳糖醛酸裂解酶（ExoPGL，E.C.4.2.2.9）；③内切聚甲基半乳糖醛酸裂解酶（EndoPMGL，E.C.4.2.2.10）；④外切聚甲基半乳糖醛酸裂解酶（ExoPMGL）。

4. 果胶酶产生菌

目前国内外研究和应用较多的果胶酶产生菌是细菌和霉菌（Kapoor *et al.*，2000；Antier *et al.*，1993），也有链霉菌产生果胶酶的报道（Beg *et al.*，2000）。在细菌中，欧文氏杆菌（*Erwinia* sp.）、芽胞杆菌（*Bacillus* sp.）、节杆菌（*Arthrobacter* sp.）和假单胞杆菌（*Pseudomonas* sp.）都产生果胶酶。耐盐芽胞杆菌属和欧文氏杆菌属主要用于苎麻和红麻的脱胶、生物制浆及污物的处理软化等方面，应用前景可观，受到较多的关注和研究。已见报道的产果胶酶的霉菌种类大约包括 20 个属，如曲霉属（*Aspergillus*）、灰霉菌属（*Botrytis*）、镰孢菌属（*Fusarium*）、炭疽菌属（*Colletotrichum*）、核盘菌属（*Scletorium*）和玉圆斑菌属（*Cochliobolus*）等。目前，黑曲霉、根霉和盾壳霉作为产果胶酶的菌株已经商品化。国内外对霉菌发酵产果胶酶的研究主要集中在曲霉属中，而曲霉属中研究最多的是黑曲霉。其原因是，果胶酶被广泛应用于食品工业中，如用于果汁、果酒及中药营养液的深加工等，使得产品质量和外观得以改善，而生产食品酶制剂的菌株必须是安全菌株。例如，黑曲霉分泌的胞外酶系可以产生大量果胶酶，而且黑曲霉属于安全菌株。另外，黑曲霉产生的果胶酶最适 pH 一般在酸性范围内，这也是其被应用于食品工业行业中的原因之一。

A 型原果胶酶主要来源于酵母及酵母状真菌的发酵液中。研究人员已经从 *Kluyveromyces fragilis* IFO0288、*Galactomyces reesei* 和 *Trichosporon penicillatum* SNO3（Lang and Domenburg，2000）中分离出了原果胶酶，依次称为原果胶酶-F、原果胶酶-L 和原果胶酶-S（PPase-F、PPase-L 和 PPase-S），另外从 *B. subtilis* IFO12113、*B. subtilis* IFO3134 和 *Tramete* sp.菌株中分离出了 B 型原果胶酶（Lang and Domenburg，2000），依次称为原果胶酶-B、原果胶酶-C 和原果胶酶-T（PPase-B、PPase-C 和 PPase-T）。内切聚半乳糖醛酸酶广泛分布于真菌和细菌中，在一些高等植物和寄生于植物的线虫中也发现了此种酶。据报道，现在已经在许多微生物的菌体中发现了这种内切酶，包括 *Aureobasidium pullulans*、*Rhizctonia solani* Kuhn、*Fusarium moniliforme*、*Neurospora crassa*、*Rhizopus stolonifer*、*Aspergillus* sp.，*Thermomyces lanuginosus*、*Paecilomyces clavisporus* 等。科研人员已经在大量的微生物种类中，对内切聚半乳糖醛酸酶进行了克隆复制，在遗传学方面进行了大量的研究。相对而言，产生外切聚半乳糖醛酸酶的微生物较少。已经报道的产生外切聚半乳糖醛酸酶的微生物有：*Erwinia carotovora*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacteroides thetaiotamicron*、*E.chrysanthemi*、*Altemaria mali*、*Fusarium oxysporum*、*Ralstonia solanacearum*、*Bacillus* sp.等（Alkorta *et al.*，1998；Prade *et al.*，1999；Hasunuma *et al.*，2003）。

5. 果胶酶的理化性质

掌握可靠的酶分析定量方法是开展果胶酶研究工作的重要前提。果胶酶的测定方法很多，各具特点，且酶活单位的定义不同，要根据不同情况加以选择对比。常用的酶活性测定方法如下（贾月等，2005）：①滴定法，滴定法主要用于测定果胶酯酶的活力，根据该酶作用机制，采用滴定羧基来评价酶活。果胶酯酶的活力还有一种测定方法，即

通过气相色谱或液相色谱仪定量分析甲醇，根据甲醇的生成量来评价酶活，此方法比较精确但要求较高。②黏度下降法，黏度下降法基于果胶物质在酶的作用下大分子降解伴随底物溶液黏度下降这一事实，以底物黏度下降的比例来评价酶活。该方法所测定的酶活性，主要反映内切酶酶活。③脱胶作用时间法，该方法根据果胶物质在未被酶解之前及在酶解反应的不同时期能在异丙醇溶剂中形成大小不等的胶团而判断酶的活性，该方法最能反映内切水解酶和内切裂解酶两种酶在实验条件下的综合能力。④还原糖测定法，无论是内切还是外切果胶酶的作用，长链果胶分子的糖苷键断裂结果都产生还原端基。这些还原端基的生成量，可用来表示酶活性。最为常用的为 DNS（3,5-二硝基水杨酸）法。⑤235nm 处紫外吸收测定法，这是专门测定裂解酶活性的一种方法。裂解酶作用于底物经历一个 β 消除反应，使底物生成的非还原端 C_4、C_5 之间带有双键的产物，该产物在 235nm 处产生最大紫外吸收，酶活性测定正是根据该反应产物而设计的。

6. 微生物果胶酶的酶学性质

国内外科学家利用层析、电泳等手段对果胶酶的酶学性质进行了研究，明确了一些果胶酶的分子质量、动力学性质及其影响因素。常用果胶酶纯化方法有：硫酸铵沉淀、丙酮沉淀、离子交换层析及凝胶过滤色谱等。果胶酶分子质量一般为 20～60kDa，以单体存在，个别以多聚体形式存在，如海栖热袍菌果胶酸裂解酶分子质量为 115.2kDa，结构为四聚体。通常果胶酶活性 pH3.0～9.0，等电点 pH4.0～9.0。其中，最适 pH4.0～6.5 的为水解酶，其作用不需要 Ca^{2+}参与。而裂解酶的作用需要 Ca^{2+}参与，最适 pH 为 8.0～10.0。不同菌株所产果胶酶性质有所不同。Alana 等（1990）采用了半固体和液体发酵两种不同的培养方式，采取凝胶过滤色谱和层析聚焦两种生化手段对 *Penicillium italicum* 生产果胶酶进行研究，发现两种培养方式产生的酶分子质量、等电点、K_m 都相同，分别为 22kDa、8.6、3.2mg/ml。最适作用温度 50℃，最适 pH6.0～7.0，远低于细菌果胶裂解酶最适 pH，Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}是其抑制剂。不同的是：该菌株液体发酵分泌果胶裂解酶可在低 pH 条件下由高酯果胶诱导。半固体发酵产生的果胶裂解酶活性高，专一性较差。Bruhlmann（1995）对无枝酸菌果胶裂解酶进行了纯化鉴定，该酶分子质量为 31kDa，最适 pH 为 10.25，等电点为 10.0，在 pH6.0～8.0 内酶活稳定，Ca^{2+}是其保持活性的必需离子。并对该酶降解果胶的产物进行了研究，先通过体积排阻色谱分离果胶酶降解产物，然后由快原子轰击电离质谱确定其组分，结果显示酶解反应初期就产生了大量的不饱和寡半乳糖醛酸，证明了该酶是内切酶。*Saccharomyces eerevisiae* 的基因 *PGL1-1* 编码的聚半乳糖醛酸酶，分子质量 42kDa，最适作用温度 25℃，最适作用 pH4.0，在 pH3.0～5.0 内酶活稳定，pH3.0 时酶活保留 80%，耐酸能力极强（Gainvor *et al.*，2000）。其他微生物果胶酶的生化特性见表 2-1。

表 2-1　几种微生物果胶酶的生化特性（Gainvor *et al.*，2000）

产酶菌株	酶的类型	分子质量/kDa	最适 pH	最适温度/℃	米氏常数/（mg/ml）	等电点
荧光假单胞菌	PNL	32.0	8.0～8.5	—	3.2	9.4
芽胞杆菌属	Exo-PC	115.0	—	—	0.86	4.6

续表

产酶菌株	酶的类型	分子质量/kDa	最适 pH	最适温度/℃	米氏常数/（mg/ml）	等电点
海栖热袍菌	PL	151.2	9.0	90	0.06	—
克鲁维酵母属	Endo-PC	36～45	5.0	40	—	5.3～5.9
青霉属	Exo-PG	20	4.0～4.7	50	2.7	5.6
青霉属	Exo-PG	74	3.9	50	0.68	4.2
核盘霉菌	PGI/PGII	42～41.5	4.0～3.5	50	—	4.8
黑星菌属	PG	43	5.0	—	0.68	—
侧孢霉属	PG	—	7.0	55	0.42	—
曲霉属	PG	60	—	—	0.19	3.55

7. 果胶酶的生物学

果胶酶是作用于果胶质的一类酶的总称，主要功能是通过裂解或 β 消除反应切断果胶质中的糖苷键，使果胶质裂解为多聚半乳糖醛酸。真菌分解果胶类物质的酶主要是耐酸的多聚半乳糖醛酸酶和耐碱的果胶裂解酶，以内切型（endo-）为主，也有外切型（exdo-）。一些真菌也产生果胶酯酶和鼠李半乳糖醛酸酶（RHG）等。PG 作用的最适 pH 一般低于 6，大部分 PG 最适作用温度为 45℃，相对分子质量（M_r）为 30 000～50 000，其前体蛋白一般包含 360～390 个氨基酸残基，基中 N 端信号肽为 17～40 个残基。PL 一般作用的最适 pH 大于 9，最适作用温度在 55℃左右，其前体蛋白一般为 370～380 个残基，但有的低于 250 个残基，有的无 N 端信号肽。已报道的 PE 前体蛋白为 331 个残基（高必达，2000；Parenicova *et al.*，2000；Wubben *et al.*，1999）。

真菌果胶酶一般有糖基化位点，功能酶以糖蛋白形式存在。例如，串珠镰孢菌（*Fusarium moniliforme*）的 endo-PG 前体有 4 个糖基化位点；玉米圆斑病菌（*Cochliobolus carbonum*）的 PGX1 N 端有 12 个残基的糖基化位点，糖蛋白 M_r 为 60 000。对 24 种曲霉 PG 的分析表明，一个内藏的 Tyr 残基与酶催化作用关系密切，在 pH10.5 时离子化；一个外露的 Tyr 残基在 pH9.3～9.5 时离子化，可能与酶催化有关。串珠镰孢菌 endo-PG 的 His^{234} 对酶活性和浸解活性起关键作用，与结合 PG1P 无关，当 His^{234}→Lys 时无酶活，Ser^{237} 和 Ser^{240}→Gly 时，酶活性分别降低 48%和 6%（高必达，2000；Parenicova *et al.*，2000；Wubben *et al.*，1999；Wei *et al.*，2002）。

纤维素结合域（CBD）在纤维素酶和木聚糖酶中广泛存在，但在果胶酶中不常见。目前发现一种来自胶孢炭疽菌（*Colletotrichum gloeosporioides*）的果胶酶含有 CBD，这是迄今发现的第一种含有 CBD 的果胶酶。细菌产生的果胶酶的 M_r 为 10 000～80 000，最适作用 pH 一般中性偏碱，最适作用温度一般为 60℃左右。菊欧文氏杆菌（*Erwinia chrysanthemi*）产生 8 种果胶裂解酶的同工酶，但其中的 PELI 更易作用于部分甲酯化的果胶，在最适碱性 pH 和 Ca^{2+}存在的条件下，还具有内切活性。菊欧文氏杆菌分泌果胶乙酰酯酶，M_r 为 34 900，前体蛋白含 322 个残基，N 端有 21 个残基的信号肽。酵母中

只有很少一部分株系产生果胶酶，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）endo-PG 的前体蛋白含 360～380 个残基，基中 N 端从 1～18 个残基为信号肽序列，381～388 残基的位置有糖基化位点，His[222] 为酶的活性区域。马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）产生的 endo-PG 的氨基酸序列与真菌的 PG 有一定的相似性，N 端 25 个残基为信号肽序列，218～230 个残基为 PG 的活性区域。

8. 微生物果胶酶基因

近 10 年来，已从不同属的真菌、细菌和放线菌中克隆和测序的果胶酶基因至少有 70 个（表 2-2），其中来自真菌的超过 40 个，且大多是多聚半乳糖醛酸酶基因。从中克隆到果胶酶基因的真菌主要有曲霉菌、炭疽菌、镰刀菌和灰霉菌等。例如，目前已从黑曲霉（*Aspergillus niger*）中克隆到 6 个多聚半乳糖醛酸酶基因，6 种 endo-PG 之间的氨基酸序列同源性达 58%～68%。草莓灰霉病菌（*Botrytis cinerea*）的 6 种 endo-PG 的氨基酸序列同源性达 34%～73%，聚类分析表明分属于 3 种不同的单系群体。在细菌中，对欧文氏杆菌的果胶酶基因研究较多，已经从菊欧文氏杆菌中克隆了 8 个果胶裂解酶基因和 2 个果胶酯酶基因，8 个果胶裂解酶基因之间的氨基酸序列有很高的一致性，但 Pell 与其他 7 个不同，它自成一个转录单元。产生果胶酶的酵母菌株比较少，从酿酒酵母中克隆到的果胶酶基因是内切多聚半乳糖醛酸酶基因 *PGL1* 和 *PGU1*，在基因组中均是单拷贝存在的。真菌果胶酶基因的可读框绝大多数被内含子分割。曲霉菌的果胶酶基因均含有内含子，多数为 3～4 个，最多的达 7 个，如 *A. tubingensis* 的多聚半乳糖醛酸酶基因 *pgaX*。除 Bcpgl 不含内含子外，草莓灰霉的其他 5 个 endo-PG 基因均含有内含子。微生物果胶酶基因表达与调控许多微生物果胶酶基因，已在酵母菌中被正确表达，如茄镰孢豌豆专化型 pelB、pelC 和 pelD 的 cDNA 转入巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）中可以表达。果胶酶一般受果胶、植物维管组织、低浓度的（0.1%）D-半乳糖醛酸、半乳糖诱导，受葡萄糖、较高浓度（1%）的半乳糖醛酸、抗体、某些抗生素（如阿莫西林）、植物的 PG 抑制蛋白（PGIP）抑制。有些果胶酶基因组成型表达。

表 2-2　已经克隆的微生物果胶酶基因

菌株	基因名称	菌株	基因名称
Aspergillus niger	*pgaI*、*pgaII*、*pgaC*、*pgaE*、*pag*、*pgaA*、*pgaB*、*peID*	*Colletorichum lindernuthianum*	*Pg1*、*pg2*、*CLP T1*、 *enpg-1*
Aspergillus aculeatus	*pgaI*、*rghA*	*Cryhonectria parasitica*	*Enpg-1*
Aspergillus oryzae	*pgaA*、*pgaB*	*Erwinia carotovora*	*Pe1A*、*pe1B*、*Pe1C*
Aspergillus parasiticus	*Pg*	*Erwinia chrysanthend*	*PaeX*、*PaeY*、*Pe1A*、*Pe1B Pe1C*、*Pe1D*、*Pe1E*、*Pe1I* 、*PeIL*、*PeIZ*
Aspergillus tubingensis	*pgaII*、*pgaX*	*Fusarium moniliforne*	*pgA*
Bacillus alcalophilus	*peIE*	*Fusarium oxysporium*	*Pg1*
Bacillus sp.	*peIA*	*Fusarium solani*	*Pe1D*

续表

菌株	基因名称	菌株	基因名称
Botrytis cinerea	*Bcp1*、*Bcp2*、*Bcp4*、*Bcp5*、*Bcp6*	*Kluyveromyces narxianus*	*EPG1*
Claviceps purpurea	*Pg1*、*pg2*	*Leptosphaeria naculans*	*Pg1*
Cochliobolus carbonum	*Pgn1*、*pgx1*	*Penicillium janthinellum*	*Pg*
Colletotrichum gloeosporioices	*Pe1-1*、*pe1-2*	*Penicillium griseoroseum*	*Pgg1*
Sclerotinia sclerotiorum	*Pg1*、*pg5*	*Saccharomyces cerevisiae*	*PGL1*、*PGV1*

9. 果胶酶的应用

利用果胶酶溶解植物细胞的细胞壁，目前，在大部分的原果汁、浓缩果汁的生产过程中，都在使用果胶酶。由于各种水果中果胶的含量差别较大，而且果胶质的成分也略有差异，因此，要根据不同品种、不同加工目的来确定果胶酶的酶组成。由于 PG 的专一性对果胶的酯化度要求不如 PL 高，在澄清果汁方面往往注重以 PG 为主的酶组成，而在提高浸出汁，特别是自流汁方面往往注重使用以 PL 为主的酶制剂。果胶物质的存在不同程度地影响或阻碍着天然产物的释放。在适宜条件下，植物细胞会发生自溶也可产生包括果胶酶在内的分解酶类，但这会使待分离产物发生结构改变，甚至产生一些大多数情况下不利于分离的小分子副产物，因此，靠植物细胞的自身酶系并不利于天然产物的提取。一般应先热失活钝化胞内酶系，再有选择地进行酶处理。天然色素如葡萄紫、番茄红、紫苏紫、萝卜红等均可使用酶法提取，但所用果胶酶不得含有花青素酶等杂酶以免影响某些产品色泽。天然生物活性物质提取物是目前中药进入国际市场的一种理想方式，出口比例已超过中药，并呈上升趋势。可利用果胶酶生产的提取物有：银杏叶提取物、大蒜油浓缩液、蘑菇浓缩液、人参浆、当归浸膏、甘草液等。另外，在金耳多糖、香菇多糖、金针菇多糖、山楂叶总黄酮等的提取中也使用了果胶酶。利用酶类提取，不仅可提高萃取率，还可提高纯度。

另外，在油料萃取方面，按照传统的生产工艺，菜籽油、棕榈油、葵花籽油、橄榄油等一般是由正己烷等脂溶性溶剂萃取制得，而正己烷是一种致癌物质。将果胶酶和纤维素酶、半纤维素酶结合使用，可破坏油料作物的细胞壁，便于油料的释放，从而提高萃取率。由于酶法提取条件温和，油料中多酚物质和维生素 E 都有所增加，从而提高油料的稳定性。纺织品的生物脱胶：用碱性果胶酶处理，代替碱对棉、麻等织物进行煮练加工和整理工艺，以除去初生胞壁中的果胶物质，在比较缓和的 pH 和温度条件下使处理后的织物手感柔软，强度高，取代了耗能大、污染严重的传统热碱脱胶工艺。另外，可避免因微生物处理造成的纤维素的降解。造纸业的生物制浆：造纸工业中的生物制浆与纺织品的生物脱胶类似，都是通过果胶酶等酶处理降解植物纤维原料中的果胶、半纤维素及木质素，使其分散成满足造纸工业不同要求的束纤维或单纤维，以生产柔软、均

一、有弹性的高品质材料。由于纸浆中高分子果胶带负电荷，经酶降解至六糖以下即可将其除去，避免了成品纸的静电现象。

带果肉食品的生产：一般常规加工所得到的果肉在必要的高温处理或机械泵出后，成型颗粒量明显减少，硬度降低，直接影响了产品品质。果胶质在 PE 作用下脱去甲氧基，在钙离子存在下形成凝胶，从而保持了果肉原有的形状和硬度。以此为基料的产品有果汁、果冻、果肉酸奶、果肉冰淇淋等。单细胞产品的生产：所谓单细胞产品是指将生物组织进行转化而形成的完整的单细胞悬液。这种单细胞内各种营养成分保存完好，表面及内部的张力较小，易稳定存在，而且易被酶类消化。它最初应用于细胞融合技术，随着制备技术的不断完善，这种单细胞产品可用于婴儿、老人及患者食品中，还可作为美容品中的活性成分，用于保湿、抗氧化、抑制黑色素生成等。酶法降解植物细胞间质中的果胶物质产生完整的单细胞悬液的过程称为浸解作用（maceration）。在浸解过程中，一方面设法使内源性果胶酯酶灭活，避免细胞软化；另一方面，用外源果胶酶适度降解胞外果胶及其他成分，避免胞内物质泄漏，降低品质。该工艺常用于生产带果肉蔬汁饮料、乳制品的配料、即食的干燥土豆泥、胡萝卜泥等食品，以及芦荟、人参、越橘叶、红花等美容保健品的配料。

利用果胶酶生产果胶低聚糖。以果胶为底物生产低聚果胶，PG 可水解细胞壁中的果胶成分产生聚合度为 10 左右的寡聚半乳糖醛酸，后者是植物防御反应的诱导因子，防御作用包括产生有抗真菌活性的抗毒素、抑制蛋白质合成的抑制剂等，而且当 endo-PG 与其抑制蛋白结合以后可进一步激活此防御反应，因此 PG 在植物致病、抗病中具有双重作用。某些中草药中的药用成分也与果胶成分有关，如艾草叶中的果胶成分是一种生物活性成分，柴胡根中的抗溃疡糖类与果胶分子中的 RG-Ⅱ有关，而人参叶中的 RG-Ⅱ也具有抗溃疡作用，柴胡根中的 RG-Ⅰ能够促进鼠 B 细胞产生 IL-6，增进机体免疫力，苍术根中的果胶片段具有肠道免疫活性。此外，果胶酶解产物还具有抑菌活性，可显著抑制乳酸菌的生长，还可作为功能性食品的配料。以几丁质、几丁聚糖为底物生产低分子寡糖，PG 可水解几丁质、几丁聚糖的 β-1,4-糖苷键，得到水溶性寡糖。这类低分子寡糖具有多方面的生理功能，如抗肿瘤、抗菌、增强免疫机能、改善肠道微生物区系的分布、刺激有益菌的生长等。另外，几丁寡糖可作为保水剂、抗菌剂、植物生长调节剂等应用于农业、食品和化妆品业。

八、芽胞杆菌饲用酶研究进展

1. 概述

近 30 年来，为满足畜牧业生产发展的需要，人们研制了许多新型饲料添加剂。微生物添加剂是活的或死的有益微生物，可通过提供维生素、蛋白质、酶、有机酸等物质，保持动物肠道微生态平衡，调节动物免疫机能，降解饲料，达到防病、促生长、提高饲料利用率的目的（Erickson，2000）。芽胞杆菌具有抗逆性强、耐高温高压、易储存等独特的生物特性，而受到人们的广泛关注（Sögaard and Suhr-Jessen，1990），并已成为一个研究热点。现将饲用芽胞杆菌的种类、作用机理、影响因素及饲用效果进行综述。饲

用芽胞杆菌种类较多，已广泛用于食品工业、制药、农业等领域，如苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*），由于它在代谢过程中释放对昆虫有较强杀灭作用的伴胞晶体而作为广谱杀虫剂广泛使用。也有一些芽胞杆菌在代谢过程中释放出有毒、有害物质，引起人或动物发病或污染食品，危害人类和动物的健康。对于饲用芽胞杆菌，各国允许使用的菌种有所不同。现有地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）、缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cercus*）、巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）、东洋芽胞杆菌（*B. toyoi*）等芽胞杆菌应用于饲料中。

2. 饲用芽胞杆菌作用机理

（1）生物夺氧

研究表明，幼畜禽初生时消化道内通常是无菌的，生后3h在胃和小肠中可发现细菌，12h后，可在大肠中检测到。按需氧菌、兼性厌氧菌、严格厌氧菌的演替顺序，最终形成以乳酸杆菌、双歧杆菌等严格厌氧菌为优势而以其他细菌为劣势的正常肠道微生态菌群。芽胞杆菌为需氧的细菌，进入体内以后，消耗大量的游离氧，降低氧化还原电势，有利于厌氧微生物的生长，保持肠道微生态系统平衡，提高机体抗病能力，减少胃肠道疾病发生的概率。Maruta 等（1996）的研究发现，采食含 10^7 个/g 枯草芽胞杆菌的饲粮饲喂3周后，粪中双歧杆菌数量显著上升，而链球菌及梭菌的数量显著下降，并且这种趋势在仔猪中较母猪更明显。

（2）分泌胞外酶

芽胞杆菌的另一大特点是能够分泌大量的胞外酶，参与饲料的降解、消化，提高饲料利用率。芽胞杆菌分泌的酶见表 2-3。许多试验研究已经表明，芽胞杆菌代谢产生的酶类对宿主的生产性能或生理生化指标产生明显影响。Guérout-Fleury 等（1995）分离得到两株枯草芽胞杆菌，发现其除能分泌大量细胞外酶如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶及卵磷脂酶等，同时也分泌活性抗菌物质及挥发性代谢产物，并且此两株菌在 pH4～8.6 时均能增殖。Kerovuo（2000）已成功从枯草芽胞杆菌中分离出产植酸酶基因，并已成功地将其在胚芽乳杆菌中进行了表达。

表 2-3　芽胞杆菌分泌的部分酶

酶的种类	产酶微生物
乙酰乳酸脱羧酶	短杆菌
碱性纤维素酶	圆形芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌
α-淀粉酶	枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌
淀粉酶	巨大芽胞杆菌
环糊精葡萄糖基转移酶	圆形芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌、软化芽胞杆菌
细胞外蛋白酶	枯草芽胞杆菌
β-葡聚糖酶	枯草芽胞杆菌[①]、多粘类芽胞杆菌
β-内酰胺酶	蜡状芽胞杆菌

续表

酶的种类	产酶微生物
果聚糖酶	枯草芽胞杆菌
β-甘露聚糖酶	圆形芽胞杆菌
金属蛋白酶	枯草芽胞杆菌
中性蛋白酶	解淀粉芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌
ＲＮＡ酶	解淀粉芽胞杆菌
木聚糖酶	短小芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌
植酸酶	枯草芽胞杆菌②

注：①数据来自 Tietyen 等（1995）；②数据来自 Kerovuo 等（1998）；其余数据均来自 Simonen 和 Palva（1993）。

（3）增强动物体的免疫功能

近年来的研究表明，芽胞杆菌能促进肠道相关淋巴组织处于高度反应的“准备状态”，同时使免疫器官的发育增快，T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的数量增多，动物的体液和细胞免疫水平提高。潘康成和何明清（1997）研究地衣芽胞杆菌对家兔免疫功能的影响时发现，饲喂 20d 后试验组胸腺、脾脏和蚓突面积系数分别比对照组提高了 5.8%、22.8%、15.5%；饲喂 40d 分别提高 11.0%、8.0%、7.9%；家兔注射疫苗免疫后第 21 天，试验组血清中免疫球蛋白含量为 16.3%，明显高于对照组的 12.8%。结果表明地衣芽胞杆菌能促进家兔免疫器官的成熟，增强家兔的细胞免疫功能作用。Inooka 等（1986）的研究也表明，以 10^7CFU/g 的剂量将枯草芽胞杆菌饲喂雏鸡时，显著提高脾脏中 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的含量，但对脾脏中巨噬细胞的活性没有影响。

（4）提供维生素、有机酸、蛋白质等营养物质

芽胞杆菌在动物肠道内生长繁殖，能产生多种营养物质如维生素、氨基酸、有机酸等，参与动物体新陈代谢，为机体提供营养物质（Norin et al., 2004）。芽胞杆菌在代谢过程中产生的有机酸为机体提供能量和营养时，也会降低局部 pH，抑制有害菌的生长、繁殖（Hosoi et al., 1999）。路福平和戚薇（1997）分离得到两株产乳酸的凝结芽胞杆菌，在体外能显著拮抗致病性大肠杆菌和沙门氏菌。芽胞杆菌代谢产生的多肽类物质（如枯草芽胞杆菌分泌的枯草菌素）对某些有害菌也有抑制或杀灭作用。

3. 影响饲用芽胞杆菌作用的因素

（1）不同菌种

不同菌种的生理生化特性、代谢产物有一定的差异，可能导致在生长过程中分泌的代谢产物（有机酸、酶等）不同，使其作用效果不同。甚至同种菌的不同菌株其生理特性也有一定的差异，使其作用效果也不相同。

（2）活菌数

研究认为，要达一定的作用效果，每克饲料中的活菌数应不低于 10^6CFU/g 饲料。活菌需进一步的萌发、定殖、增殖、分泌代谢产物后才能发挥其功能。

（3）动物个体

当动物处于健康、生产性能良好时，添加芽胞杆菌并不能进一步提高动物的生产性能，而只是起到一定的保健作用。而当机体处于疾病，尤其是发生胃肠道疾病时，添加芽胞杆菌能起到较好的治疗作用，并改善动物的生产性能。同时，动物的年龄、性别、种类也影响芽胞杆菌的作用效果。

（4）作用时间

芽胞杆菌进入消化道内并不能迅速发挥其作用，它对胃肠道也有一个适应的过程，然后寻找机会定殖萌芽，长成营养体，不断繁殖，形成一定数量，逐步发挥其作用。因此，如果作用时间过短或不连续饲喂，则达不到作用效果。

（5）其他因素

与其他微生物添加剂（双歧杆菌）相比，芽胞杆菌更耐高温、高压、水分、酸、碱、防霉剂等不利外界环境（Leejeerajumnean *et al.*，2000），但许多不利因素共同作用时，其抵抗力会下降很多，尤其在贮藏过程中，如果水分含量较高同时在饲料中添加有抗生素或防霉剂，会大量杀灭芽胞杆菌。另外，研究表明，不同的添加方法其效果也不一样。一般而言，拌料的效果好于饮水的效果（Jin *et al.*，1996）。研究表明，水分对饲料中芽胞杆菌的存活率影响最大，随着水分的升高和时间的延长，芽胞杆菌的存活率显著下降。

4. 饲用芽胞杆菌的作用效果

（1）有预防、治疗效果

众多研究表明，芽胞杆菌制剂在预防、治疗腹泻病及“摔死症”上有很好的疗效。Zani 等（1998）将两个水平的蜡状芽胞杆菌添加于饲料中饲喂仔猪发现，与对照组的腹泻率 36.2%相比，处理组的腹泻率分别为 18%和 17.4%，差异显著（$P<0.05$）。研究认为，不论体内、体外，蜡状芽胞杆菌对大肠杆菌的生长均具有抑制作用，但对轮状病毒不起作用。马春全等（2000）将地衣芽胞杆菌添加到鸡饲料中，发现可使肉用仔鸡的腹泻死亡率下降 93.3%，生长增重提高 42%；对 58 头腹泻犊牛的有效率为 95%，治愈率为 80%；对 156 头腹泻仔猪的试验认为其有效率为 90%，治愈率为 75%。侯德联等（1997）用“调痢生”预防牛“摔死症”4607 头，死亡 2 头，死亡率为 0.04%。Kyriakis（1999）分别用地衣芽胞杆菌和东洋芽胞杆菌饲喂 28 日龄断奶仔猪时发现，与对照组相比，处理组能显著降低由肠毒素大肠杆菌引起的腹泻和死亡（$P<0.05$），并且添加量越高，效果越明显。

（2）改变饲料转化率、体增重等指标

闫凤兰等（1996）的研究认为，在饲料中添加枯草芽胞杆菌可提高仔鸡增重和饲料转化效率（$P<0.05$），并能起到抑制消化道中的大肠杆菌、沙门氏菌和促进乳酸杆菌生长的作用。张国龙和李德发（1994）用同一种蜡状芽胞杆菌对断奶仔猪共进行 4 次试验，前 3 个试验表明，添加芽胞杆菌组的平均日增重、日采食量均略低于对照组，饲料转化效率也有所下降，但差异均不显著（$P>0.05$）。而第 4 个试验却明显表现出处理组对饲料利用率的提高和对仔猪生长的促进作用，日粮中干物质与粗蛋白质的表观消化率显著提高，粪氮与尿氮的排出量减少。Cavazzoni 等（1998）研究认为，凝结芽胞杆菌可提高

仔鸡的生长速度及饲料转化效率。孙鹏（2011）研究表明，饲喂纳豆枯草芽胞杆菌提高了犊牛日增重和饲料转化率，提前了犊牛断奶日龄，从而提高了犊牛生长性能。Cavazzoni 等（1998）比较了维吉尼亚霉素与凝结芽胞杆菌对肉仔鸡的作用效果，日增重两者无差异并且均显著高于对照组，研究认为，凝结芽胞杆菌同维吉尼亚霉素一样均具有促生长和预防作用。

（3）其他生理生化指标

汪琳仙等（1996）研究表明，以蜡状芽胞杆菌为主的复合微生态制剂对鸡红细胞比容、血红蛋白及血浆蛋白等值没有影响。但与对照组相比，可使鸡血浆β-脂蛋白显著升高，7 周龄鸡血中葡萄糖明显升高；并且血浆 T4 含量显著升高，T3/T4 值下降。Santoso（1995）的研究表明，枯草芽胞杆菌可以提高血清磷脂浓度，降低屠体磷脂，但对肝磷脂含量无影响。

（4）减少环境污染

Santoso 等（1995）的研究表明，饲料中添加枯草芽胞杆菌不仅可以提高饲料转化率和氮的利用率，而且可以减少氨的产生，这主要是因为芽胞杆菌在大肠中产生的氨基化氧化酶及分解硫化物的酶类可以将吲哚类化合物完全氧化成无臭无毒害和对环境无污染的物质。

5. 饲用芽胞杆菌的发展方向

（1）复合菌制剂

芽胞杆菌相对于双歧杆菌、乳酸杆菌等发挥作用较慢，利用复合菌制剂，可以弥补各自的不足，更快、更好地发挥作用。张建梅等（2012）研究表明，复合微生态制剂可以显著降低断奶仔猪的料重比，降低粪便中大肠埃希菌数量，促进血液红细胞和血红蛋白的含量，提高断奶仔猪的免疫水平。李相安和乔益磊（1999）用含多株芽胞杆菌、乳酸杆菌和酵母菌的复合菌制剂对肉仔鸡进行试验表明，处理组的成活率较对照组高 4.05%，差异极显著（$P<0.01$）；增重较对照组高 7.02%，差异极显著（$P<0.01$），能提高免疫力，增强体质，降低死亡数，显著促进生长发育。张日俊等（2005）的研究认为，添加量为 0.1%～0.2%的复合菌制剂“益生康”（芽胞杆菌、乳酸菌和酵母菌）饲喂肉仔鸡能明显提高增重和饲料转化率（$P<0.05$），并能明显刺激胸腺、脾脏和法氏囊的发育，增强机体的免疫功能；同时能显著增加血清中总蛋白、球蛋白的含量（$P<0.05$）。董秀梅等（2004）研究表明，复合微生态制剂组与对照组比较显著地增加了肉仔鸡肠道内乳杆菌、肠球菌的数量，同时显著地降低了肠道内大肠杆菌的数量；另一方面复合微生态制剂能显著提高肉仔鸡血清中 SOD、GSH-PX 的活性，降低血清中 MDA 的含量，明显提高机体的抗氧化机能，增强了肉仔鸡的抗病力。张超范和魏萍（2005）在肉仔鸡饮水中添加益生菌来比较不同复合微生态制剂对肉仔鸡局部免疫和降血脂效果的影响。结果表明，益生菌可显著提高肉仔鸡局部免疫水平，明显降低血清中总胆固醇含量，同时可提高高密度脂蛋白的含量；可提高局部黏膜免疫水平和机体的健康状态。

（2）与某些抗生素联用

有人提出可以将饲用微生物与抗生素联用，来达到提高动物生产性能的目的

（Castaldo 和程伟，1991），但也有人提出反对意见。倪学勤等（1999）测定了 30 株益生芽胞杆菌对 15 种抗生素的敏感性，结果 90%菌株抗磺胺嘧啶，对其余抗生素大部分菌株敏感。

（3）与其他添加剂联用

与酶制剂联用是一个发展方向。李桂杰（2001）的研究认为将益生素、酶制剂与饲用双歧因子协同使用时可以将酶制剂的用量减少一半同样达到增重的目的，并认为酶制剂用量的减少可能是因为益生素在动物肠道中产生部分酶类。苏军等（1999）研究了芽胞杆菌与柠檬酸的联合应用，研究认为益生素与有机酸在某一添加范围内组合使用，可提高肉鸡的生产性能，使肉鸡生产性能达最佳时二因素的水平组合为：益生素 0.41%～0.63%，有机酸 0.43%～0.64%。

（4）利用基因工程技术制造多功能饲用芽胞杆菌

研究认为，可以利用基因工程手段对饲用微生物进行改造，增加特定代谢产物的含量或导入其他基因使其产生之前并不表达的产物，以发挥多种效用。倪学勤（1998）将二氨基庚二酸脱羧酶基因转入筛选到的受体中表达，研制成赖氨酸工程菌，使其不仅起到预防和治疗幼龄动物腹泻的作用，也为机体提供足够的赖氨酸，降低了饲料成本。

饲用芽胞杆菌在畜牧业生产中应用已有几十年的历史，但由于影响其作用的因素太多，人们对它的研究还不够深入，尤其对芽胞杆菌的作用机理，现在也只是提出了一些假设，还缺乏一定的体内试验证据。为进一步应用好饲用芽胞杆菌，应对以下问题进行广泛深入的研究：①芽胞杆菌抗菌、促生长的机理；②芽胞杆菌-肠道菌群的互作效应；③芽胞杆菌激活动物免疫系统的机理；④芽胞杆菌的应用对象、范围。

6. 芽胞杆菌饲用酶作用机理

（1）概述

长期以来，由于动物饲养和饲料中广泛使用抗生素、化学合成药物、激素、β-兴奋剂、重金属、镇静剂等促生长保健剂，导致了诸多现实的问题：畜禽和水产品中药物残留严重，畜禽产品品质下降，缺乏市场竞争力和信任感；细菌耐药性增强，威胁人类安全；破坏生态环境等。应用益生菌制成微生态制剂，是近年发展起来的一种新型绿色饲料添加剂。它可提高健康水平及生产性能，对动物具有无毒无害、无残留等特点。益生菌的促生长效果受多种因素影响，如动物生理状态、饲料加工工艺、菌株组成及其定殖能力、温度、pH、活菌的保存时间等。目前，可用于饲料添加剂领域工业化生产的菌种很多，我国农业部（2008）公布的饲用微生物添加剂有 15 种，包括地衣芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、两歧双歧杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、乳酸肠球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸乳杆菌、植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、产朊假丝酵母、酿酒酵母、沼泽红假单胞菌。其中芽胞杆菌、酵母菌和乳酸菌是应用最多的微生物添加剂菌种。芽胞杆菌由于稳定性好、抗逆性强、复活率高，通过与病原菌竞争营养物质，抑制病原菌，提高机体的免疫机能，并提供营养物质等，调节消化道健康，增强动物体的免疫功能，达到促进目标动物的生长、提高饲料的转化率的目的。以下将介绍芽胞杆菌的生长繁殖及其营养和免疫的特点。

（2）芽胞杆菌作为益生菌的特性

1）芽胞形成和结构。某些细菌在生长后期能够形成一种特有的休眠状态的细胞，称为内生孢子，也称为芽胞。芽胞杆菌的芽胞直径一般小于菌体直径，圆形、椭圆形，为好氧细菌。芽胞的形成是一个极其复杂的过程，包括形态结构、化学成分等多方面的变化。光学显微镜和电子显微镜观察研究的结果，表明芽胞的形成在结构上主要经历以下几个阶段：核物质融合成轴丝状（杆状）；在细胞中央或一端，细胞膜内陷形成隔膜包围核物质，产生一个小细胞；小细胞被原来的细胞膜包围，生成前孢子。前孢子实质上是一个被两层同心膜包围着的原生质体，在光学显微镜下观察未染色的活细菌，可以看到前孢子是一个清亮的、与菌体其他部分明显不同的区域；前孢子再被多层膜包围，如皮层、孢子衣等，最后成为成熟的芽胞，由于细胞壁的溶解而释放出来。

2）芽胞形成过程中化学成分也发生很大变化。生芽胞的细胞大量吸收钙离子并大量合成营养细胞中没有的吡啶二羧酸。在成熟的芽胞中，芽胞原生质体含有极高的吡啶二羧酸钙，在新合成的、具有特殊化学构造的外层（皮层和孢子衣，有时还有芽胞外壁）中也有这种物质。芽胞的壁含有一种特殊的肽聚糖，所有芽胞基本上都一样，但与营养细胞的细胞壁肽聚糖不一样。同时，芽胞中还含有一些特殊的蛋白质。由于芽胞在结构和化学成分上均有别于营养细胞，因此芽胞也就具有了许多不同于营养细胞的特性。

3）芽胞特点。芽胞最主要的特点就是抗性强，对高温、紫外线、干燥、电离辐射和很多有毒的化学物质都有很强的抗性。同时，芽胞还有很强的折光性。在显微镜下观察染色的芽胞细菌涂片时，可以很容易地将芽胞与营养细胞区别开，因为营养细胞染上了颜色，而芽胞因抗染料且折光性强，表现出透明而无色的外观。研究表明，芽胞抗逆性的机制主要是由于其含水量低（40%）、含有耐热的小分子酶类、富含大量特殊的吡啶二羧酸钙和带有二硫键的蛋白质，以及具有多层次厚而致密的芽胞壁等，使得芽胞具有了抗逆性。自由存在的芽胞没有明显的代谢作用，只保持潜在的萌发力，称为隐藏的生命。一旦环境条件合适，芽胞便可以萌发成营养细胞。在孢子状态下稳定性好，能耐氧化；耐挤压；耐高温，能长期耐高温，如枯草芽胞杆菌在 95℃温度下 5min，89%能保持存活；耐酸碱，在酸性胃环境中能保持活性，可以耐唾液和胆汁的攻击，加工成饲料后95%可在动物体内萌发成营养体。

（3）芽胞杆菌对动物的营养和免疫特性

1）产生多种消化酶。芽胞杆菌能产生多种消化酶，芽胞杆菌具有很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性，可降解饲料中的某些抗营养因子，提高饲料转化率可达 8%以上。在肠道内生长繁殖，能产生各种营养物质如维生素、氨基酸、未知促生长因子等，参与机体的新陈代谢，促进动物生长。这是其提高动物生产性能的一个重要方面。宋文龙（2013）报道枯草芽胞杆菌能产生多种消化酶包括蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶，帮助动物消化吸收营养物质，同时还具有降解饲料中复杂碳水化合物的酶，如降解果胶、葡聚糖、纤维素等的酶，其中很多是动物本身不具有的酶。芽胞杆菌生长繁殖过程中还能够产生植酸酶，促使动物对植酸磷的利用和对脂肪的消化吸收；产生的氨基氧化酶及分解硫化氢的酶类，可将吲哚类氧化成无毒、无害的物质，从而降低畜禽舍内氨气、硫化氢的浓度和臭味，减少环境的污染。芽胞杆菌的芽胞在形成前后产生活性很强的淀粉酶和中性

蛋白酶，这两种酶不是诱导酶而是与芽胞形成有关，其中，淀粉酶能把淀粉水解成糊精，也能把葡萄糖聚合成多糖；中性蛋白酶与多肽类物质的出现密切相关，这些多肽类的合成与芽胞形成前后中性蛋白酶的出现同步。两种酶与芽胞在动物肠道内代谢时产生的淀粉酶、中性蛋白酶不是一种酶，所用底物不同，产物也不同。

2）产生多种营养物质。芽胞杆菌能够合成多种维生素如叶酸、烟酸、维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_6、维生素 B_{12} 等，促进机体对蛋白质的消化、吸收。凝结芽胞杆菌、芽胞乳杆菌等菌株能产生乳酸，可提高动物对钙、磷、铁的利用，促进维生素 D 的吸收。此外，芽胞杆菌在其生长繁殖过程中能够产生乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸，这些酸类能够降低动物肠道的 pH，可有效抑制病原菌的生长，为乳酸菌的生长创造了条件，其中丙酸还能够参与三羧酸循环，为动物新陈代谢提供能量。

3）增强动物体的免疫功能。研究表明，芽胞杆菌能促进肠道相关淋巴组织，使之处于高度反应的“准备状态”，同时使免疫器官发育增快，免疫系统成熟快而早，T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的数量增多，使动物的体液和细胞免疫水平提高，增强机体抗病能力。Fuller（1989）和 Inooka 等（1986）都指出芽胞杆菌可提高动物抗体水平或提高巨噬细胞的活性。实验表明，该菌能显著提高动物脾脏的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞比例，对动物的细胞免疫有重要的作用。芽胞杆菌能促进机体免疫特别是使局部免疫提高，使分泌型 IgA 的分泌增加。芽胞杆菌可使动物血清中的中性粒细胞吞噬率提高 17%，能显著增加血清中总蛋白、球蛋白的含量，也能增加机体内蛋白质的沉积，显著增加血清中特异性抗体的水平，增强特异性免疫应答能力，当机体遇到病原攻击时，可以产生高水平的抗体以消灭侵入的病原菌。

4）拮抗作用。正常微生物通过占位性保护作用，即竞争黏附位点来阻止病原菌附着。芽胞杆菌进入动物胃肠道后，通过生物夺氧作用在生长繁殖过程中消耗肠内过量的气体，造成厌氧状态，而抑制需氧的有害菌的生长繁殖。并且，芽胞杆菌在生长繁殖过程中可产生细菌素、有机酸等物质，改变肠内微生态环境，形成了不利于有害菌生长繁殖的肠内环境。芽胞杆菌在动物肠道内产生大量细菌素，包括杆菌肽、多黏菌素、线性环多肽复合物等，可有效抑制和杀灭进入体内的大肠杆菌和沙门氏菌等致病菌。

5）防止有害物质的产生。芽胞杆菌在肠道内可产生氨基氧化酶及分解硫化物的酶类，可降低血液及粪便中氨、吲哚等有害气体浓度，形成对动物机体更有利的平衡状态；同时，动物排泄物、分泌物中的有益微生物数量也增多，病原微生物减少，从而净化了体内外环境，减少疾病的发生。

九、芽胞杆菌饲用酶生猪养殖应用研究进展

1. 概述

由于环境日益恶劣，猪生存的生态环境遭到严重破坏，集约化、规模化饲养更是使猪的很多天性无法得到表达，产生很多行为上的变异，如母猪的犬坐、空嚼等，这都使猪抵抗疾病的能力大大降低。而且现今病毒的变异能力越来越强，单一的疫苗很多时候不能起到很好的预防疾病的效果。对于疾病的治疗很多时候只能是治标不治本。猪患病

之后治疗效果不一，会严重影响其生产性能。因此，很多兽医专家提出了“养重于防、防重于治、综合防治”的疾病防控原则，而微生态制剂的优点就是“患病治病、未病防病，无病保健”，能够对猪的健康和疾病的防控产生很大的正面效应，从而使微生态制剂在养猪业中的应用也越来越广泛。微生态制剂应用于养猪生产，在提高猪的生产性能和饲料利用率，提高机体免疫力，改善猪肉品质，减少养殖过程中产生的恶臭，防治环境污染等方面具有广阔的应用前景，而芽胞杆菌制剂更是其中的佼佼者。

2. 芽胞杆菌能够提高猪的生产性能

芽胞杆菌在快速繁殖过程中，会产生大量多种维生素、有机酸、氨基酸、蛋白酶（特别是碱性蛋白酶）、糖化酶、脂肪酶、淀粉酶，能降解植物性饲料中复杂的有机物，从而促进猪对营养物质的消化吸收，提高饲料利用率，防止猪消化不良、出现“饲料便”等状况。李国建（2004）的实验结果表明，生长肥育猪饲料中添加 100mg/kg 凝结芽胞杆菌可提高平均日增重，降低饲料成本和沙门氏菌阳性率，饲养效果比 100mg/kg 利菌净好，而且这些添加剂在不降低生产性能的前提下，均能够替代抗生素或抗菌药作为生长促进剂使用。宁福胜等（2001）实验表明，微生态制剂能够取代断奶仔猪饲粮中的抗生素、抗菌类添加剂。霍军等（2004）通过在生长肥育猪饲料中添加凝结芽胞杆菌制剂与抗生素对比研究表明，饲料中添加 100mg/kg 凝结芽胞杆菌制剂可显著提高平均日增重，降低饲料成本和沙门氏菌阳性率，饲养效果与添加 100mg/kg 抗生素没有显著差异。张灵启等（2008）的实验证明，与对照组相比，添加芽胞杆菌使仔猪日增重提高了 37.11%（$P<0.05$），料肉比下降 24.37%。实验结果表明，饲粮中添加芽胞杆菌改善了仔猪的生长性能，显著提高了日增重，降低了料肉比。Kirchgessner 等（2004）报道仔猪基础日粮中添加蜡状芽胞杆菌（10^7CFU/kg、10^8CFU/kg、10^9CFU/kg 饲料）后，仔猪的日增重较对照组明显提高，其中每千克饲料中添加 10^8CFU 最好，提高 11.1%，同时，饲料采食量也得到显著提高，但饲料转化效率没有得到明显的改善。Kyriakis 等（1999）研究表明，日粮中添加地衣芽胞杆菌（10^{10}CFU/kg 饲料）较对照组显著提高了平均体重和平均日增重（$P<0.05$），增长幅度分别为 13.7%和 99.3%；饲料采食量比对照组提高 26.8%（$P<0.05$）；饲料转化效率也得到明显的改善（$P<0.05$）。此报道还表明，蜡状芽胞杆菌（10^9CFU/kg 饲料）也可提高仔猪的生产性能（$P<0.05$）。Alexopoulos 等（2004）认为妊娠后期的母猪采食添加蜡状芽胞杆菌的饲料后，乳汁中脂肪含量较对照组提高 0.48%（$P<0.05$），体重下降幅度也明显降低；每头母猪的断奶仔猪数显著增加（$P<0.05$），仔猪的病死率和腹泻率显著降低（$P<0.05$），而体重增加了 0.56kg（$P<0.05$）。

3. 芽胞杆菌能够增强猪的免疫能力

仔猪肠道感染时，肠道的正常微生物调动肠壁固有层的免疫细胞通过免疫反应形成机体的第二道防线。肠道细菌和其他抗原进入机体的主要通道是通过 M 细胞的传递，M 细胞将抗原传递给抗原递呈细胞（位于肠上皮细胞内的巨噬细胞和 B 细胞），抗原递呈细胞将抗原呈递给邻近的 T 细胞，引起反应性 T 细胞的增殖。T 细胞被激活的同时，B 细胞也被激活，通过外周游离肠道固有层，开始分泌特异性的抗体。分泌型 IgA 由固有

层的B细胞分泌到肠腔，将病原菌包裹起来，防止其黏附和促进肠道将病原菌排出体外。在仔猪出生后的第一周主要依靠母乳的抗体和非免疫因子来保护。

曹国文等（2003）的试验表明，用蜡状芽胞杆菌悬浮剂治疗断奶仔猪应激性腹泻，疗效显著，治愈率高达 96.08%。潘康成等（1997）研究认为，地衣芽胞杆菌的免疫促进作用是机体经口服芽胞杆菌后，在肠道淋巴组织集合的抗原结合位点上直接作为免疫佐剂，或者通过调整宿主体内的微生物群，尤其是双歧杆菌群起主导，间接地发挥免疫佐剂的作用，提高机体局部或全身防御功能。陈旭东等（2010）研究发现，蜡状芽胞杆菌能产生细菌素并可以拮抗致病菌；用 0.2%的芽胞杆菌饲喂 35 日龄仔猪，日增重极显著提高（$P<0.01$），料重比和腹泻率显著降低（$P<0.05$）。倪学勤等（2008）的实验结果表明，日粮中添加芽胞杆菌对 IgA 和 IgM 的水平有一定的提高作用，根据实验结果推测，添加芽胞杆菌可能影响了断奶仔猪体内的物质代谢，增加了采食量，提高了仔猪蛋白质营养摄入水平，降低了早期断奶仔猪体内的蛋白质分解，加强了氮沉积，对机体的氮负平衡有纠正作用，可较好地保证血液中的抗体正常适度地合成、分泌，增强肝脏合成蛋白质的能力，从而提高机体免疫力。Fuller（1989）指出，直接饲喂活的微生物可刺激动物免疫器官发育，提高动物抗体水平或巨噬细胞活性，增强机体免疫功能。

4. 芽胞杆菌消除粪尿恶臭

许多微生态制剂进入猪体后与肠道内有益菌相互协同，有效增强肠的活动能力，提高蛋白质利用率的同时，由于肠道有益菌的大量增殖，势必会抑制大肠杆菌等的活动，从而减少蛋白质向氨和胺的转化，使肠内和血液中氨的浓度下降，减少随粪便排出的氨量，使臭味得到有效控制，改善了舍内空气质量，减少了机体应激，降低了环境污染程度。而芽胞杆菌能够除臭驱蝇，减少污染，控制细菌性疾病，能减少粪便中氮、磷、钙的排泄量，减少粪便臭味及有害气体排放，表现为动物粪便臭味逐步减轻，减少饲料蛋白质分解为氨气，从而减少环境污染。张庆宁（2009）从生态养猪模式的发酵床中分离纯化到 14 株优势好氧细菌，通过形态学、16S rDNA 序列分析和同源性比较，鉴定其均为芽胞杆菌属的不同种。发酵床中优势芽胞杆菌的特点各异，大多数能够分泌过氧化氢酶、脲酶、蛋白酶等酶类，利用猪粪迅速生长，除臭效果良好；并且在特定时期能够产生某些物质对 *Staphylococcus aureus* 25923 和 *Escherichia coli* 25922 的生长产生抑制作用，达到消纳粪便、抑制病原菌、促进猪生长的作用。芽胞杆菌属的细菌由于芽胞保护，能耐受发酵高温，生长优势强，适合在发酵床中发挥优势作用。Davis 等（2012）的实验结果表明，来自饲喂芽胞杆菌组猪栏中的粪样分解时间比饲喂对照日粮组缩短了 33%。吴凤笋等（2012）指出，芽胞杆菌在大肠中产生的氨基化氧化酶及分解硫化物的酶类可以将臭源化合物完全氧化成无臭无毒害和对环境无污染的物质。

尽管我国对微生态制剂的研究比一些发达国家起步晚，但是空间大、进展快，微生态制剂的应用已在一定程度上推动了我国养猪业的发展。微生态制剂可促进畜禽的生长发育、提高机体免疫力、减少畜禽疾病、提高饲料利用率、降低对环境的污染，同时为人们提供品质好、无公害的畜产品。有的学者预言：光辉的抗生素时代之后，将是一个崭新的微生态时代。作者相信随着研究的不断深入、科学的不断发展，微生态制剂将有

着非常广阔的应用前景，而对畜牧业的发展必然产生很强的推动作用。

十、芽胞杆菌饲用酶水产养殖应用研究进展

1. 概述

随着社会经济的不断发展，人们对水产养殖产品的需求越来越大，水产养殖逐步向工业化、规模化养殖的方向发展。高密度的养殖模式、抗生素的滥用、喹乙醇等禁用添加剂的非法使用也对水产养殖业健康发展造成了严重的危害。残留毒素、污染生态环境、威胁人体健康等负面影响成为整个行业健康发展的瓶颈。近年来，微生态制剂在畜牧兽医、人类健康等方面推广应用，大量实验和生产实践证实微生态制剂的应用疗效，其在水产行业中的应用也越来越受人们的重视。微生态制剂具有绿色、环保等优点，在养殖中微生态制剂可以用来解决水产养殖污染和病害的问题。自然界广泛分布着芽胞杆菌，能产生多种酶，是动植物微生态系统优势种群之一，在水产养殖中发挥着重要作用。

2. 水产养殖应用的芽胞杆菌益生菌种类

生物制剂的研发和使用过程中最重要的问题是确保其使用的安全性。美国食品药物管理局（FDA）1989 年发布的允许使用的菌株有 43 种，芽胞杆菌包括枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）、缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）、地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）和凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）。2008 年，我国农业部公布的《饲料添加剂品种目录》中，允许直接投喂动物的微生物添加剂有 15 种，其中芽胞杆菌有地衣芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌两种。随着国内外研究的深入，允许使用的芽胞杆菌种类越来越多，相继研发出了生物学特性更加优异的新菌种，如环状芽胞杆菌（*B. circulans*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、芽胞乳杆菌（*Lactobacillus sporogens*）、纳豆芽胞杆菌（*B. natto*）、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）、巨大芽胞杆菌（*B. megeterium*）、丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*）和东洋芽胞杆菌（*B. toyoi*）等，这些新菌株的发现壮大了芽胞杆菌添加剂的数量，为养殖行业的健康稳定发展提供了技术支持。

3. 水产养殖应用的芽胞杆菌生物学功能

（1）促进动物营养物质的消化吸收

芽胞杆菌产生多种酶类，是该类制剂能够促进动物生长的一个重要原因。据 Pranter 等（2012）研究，芽胞杆菌能有效促进肠道发育，增加肠黏膜的厚度、肠绒毛的高度及细胞密度，该研究成果解释了芽胞杆菌类微生物添加剂促进动物生长、提高饲料利用率和日增重的原因。柏建玲等（2003）对地衣芽胞杆菌的产酶能力进行研究，结果表明，地衣芽胞杆菌能产生淀粉酶、蛋白酶及植酸酶。Muroga 等（2004）研究表明，在蜡状芽胞杆菌作用下，仔猪空肠中的脂肪酶活性大大提高，空肠食糜中细菌产生牛磺胆酸解聚酶的活性降低。曹煜成等（2010）报道，对黄鳍鲷（*Sparus latus*）养殖中定期泼洒地衣芽胞杆菌，结果表明用地衣芽胞杆菌饲养黄鳍鲷的成活率、体长增长率和体重增长率提高 18.2%、21.0%和 31.2%。温俊和孙鸣（2008）将枯草芽胞杆菌添加到牙鲆饲料中，结

果能显著提高牙鲆肠道的脂肪酶、蛋白酶和淀粉酶活性，降低饲料系数等。付天玺等（2008）研究凝结芽胞杆菌对奥尼罗非鱼生长的影响，将其添加在饲料中，结果显示胃蛋白酶活性提高 30.59%，消化吸收率提高 10.68%，蛋白质表观消化率提高 4.71%，增重率提高 10.76%，饵料系数降低 9.2%。

（2）调节动物消化道的微生态平衡

正常健康的动物消化道内存在大量的各种微生物群落，这些菌群保持着良好的生态平衡，共同维持着宿主的健康生长。如果这些菌群失去了生态平衡，轻则造成消化道机能紊乱，抑制宿主健康生长发育，严重时可危及生命。日粮中添加微生态制剂，动物消化道内正常有益菌群得到有效补充，使得有益菌在数量上占据优势，并占据了动物肠壁上的靶细胞，能够形成有益生物保护防线。这些有益菌群在增殖过程中能够产生大量的生物酶类，通过拮抗作用抑制有害微生物的生长繁殖，从而维持肠道菌群的生态平衡，进而防止病害的发生。刘文斌等（2013）用地衣芽胞杆菌、双歧杆菌、大肠杆菌、乳酸菌混合培养发现，地衣芽胞杆菌对大肠杆菌具有抑制生长作用，而对双歧杆菌、乳酸菌有促进和共生作用。宋增福等（2006）研究表明，丁酸梭菌、鳗弧菌共同孵育培养黏附上皮细胞时，丁酸梭菌显著抑制鳗弧菌黏附细胞的能力，其黏附率降低 7.03%。Urdaci 等（2004）报道，凝结芽胞杆菌在生长过程中产生的酶等抑菌物质对金黄色葡萄球菌、艰难梭菌、链球菌等有良好的抑制作用。

（3）增强动物免疫能力与抗病能力

能够促进动物免疫能力是微生态制剂的作用机能理论之一。芽胞杆菌能增强动物机体免疫功能的原理，一部分学者认为与其代谢产物、细菌形态结构有关。大量研究表明，芽胞杆菌具有提高动物机体免疫能力的作用。芽胞杆菌使动物肠道内相关的淋巴组织处于免疫准备状态。动物免疫器官发育速度加快，免疫系统成熟时间提前，T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的数量增多。部分芽胞杆菌，如凝结芽胞乳杆菌等能促进宿主消化道黏膜免疫的发生。潘康成（1996）研究指出，口服芽胞杆菌后，免疫促进作用的机理是作用于肠道集合淋巴结的抗原结合位点或者通过调整动物的微生物群，特别是双歧杆菌菌群间接地发挥免疫复活作用，进而提高宿主的防御功能，达到增强抵抗力、降低饲料系数的作用。周国勤等（2006）研究表明，饲料日粮中添加纳豆芽胞杆菌及其发酵产物，能够显著促进试验鱼血液中的 NBT 阳性细胞数量增加和溶菌酶活性上升，增强鱼的非特异性免疫能力。季奎文和吕学敏（2005）研究表明，凝结芽胞杆菌能提高宿主腹腔内巨噬细胞吞噬活性，加强吞噬细胞能力，增强动物 NK 细胞活性，促进动物免疫器官的发育等功能。

4. 芽胞杆菌在水产养殖业中的应用

（1）芽胞杆菌在水产饲料中的应用

芽胞杆菌作为水产养殖用添加剂，一些研究证明其能够促进养殖品种加速生长。降低饲料系数，维持肠道微生态平衡，增强动物机体免疫力，提高抗病能力和减少污染等。许国焕等（2008）研究认为，在日粮中添加枯草芽胞杆菌与凝结芽胞杆菌，奥尼罗非鱼体重提高分别 12.27%和 8.56%；饲料系数分别降低 10.92%和 8.18%。枯草芽胞杆菌使饲

料、蛋白质表观消化率分别提高 10.54%、4.18%；凝结芽胞杆菌使饲料、蛋白质表观消化率分别提高 10.07%、3.63%。枯草芽胞杆菌与凝结芽胞杆菌使奥尼罗非鱼具有良好的吸收和消化能力，生长发育速度较快。於叶兵（2007）研究指出，在斑节对虾饲料中添加不同剂量的地衣芽胞杆菌，结果能够显著提高饲料中干物质、氨基酸、粗蛋白质及磷的表观消化率，沈锦玉等（2004）在饲料中添加枯草芽胞杆菌 B115，结果显著提高了宿主肠道内消化酶的活性，并且能增加肠道中有益菌群（如双歧杆菌和乳杆菌）的数量，但是对气单胞菌、肠球菌和肠杆菌的量没有显著影响。Kumar（2006）研究表明，饲料中添加 1.5×10^7 个芽胞杆菌，能显著提高鲤鱼巨噬细胞呼吸暴发能力和抗嗜水气单胞菌的能力，增强鲤鱼非特异性免疫能力。Sid 等（2012）给虹鳟鱼口服一定量的丁酸梭菌，可显著增强虹鳟鱼对弧菌病的抵抗能力。

（2）芽胞杆菌对养殖水体环境的作用

与湖泊、河流等自然水体相比，人工养殖池塘是人为控制的生态系统，其中的各种理化性质及生物因子关系十分复杂脆弱，随着养殖的进行，水体环境容易受到各方面因素的影响。人工养殖池塘中的微生物是其生态系统的重要组成部分，水体中的微生物种类及含量容易受到外部环境的影响。在养殖过程中，添加外源的有益微生物，能够比较容易地改变水体中的微生物种类及数量。通过人工调控，优化养殖水体环境的微生物组成及数量，促进分解池塘养殖过程中产生的有机污染物如残余饲料及排泄废物，抑制病原微生物的生长繁殖。许多水产养殖专家对芽胞杆菌在水产养殖中的应用进行了探索研究，结果显示，芽胞杆菌具有良好的脱氮去磷活性，在养殖水体中使用芽胞杆菌能有效降低水体中化学需氧量（COD）、NO_2^--N、NO_3^--N、NH_4^+-N 及 PO_4^--P 的浓度，改善养殖水体质量。曹煜成等（2010）研究表明地衣芽胞杆菌可有效降低对虾粪便释放出来的 NO_3^--N、COD 的含量。杨艳等（2007）研究显示巨大芽胞杆菌能够有效降低养殖水体中 NO_2^--N 的浓度，但是对 NH_3^--N 则无降解效果。王彦波（2004）研究认为，在鲫鱼（*Carassius auratus*）养殖过程中，使用枯草芽胞杆菌，可使水体中 NO_2^--N 浓度降低 50%以上，而水体中的 NH_3^--N 提高 13%。水产养殖中水质的污染很大一部分来自于残余饵料，其中最主要的是蛋白质和淀粉的残留。谢航等（2008）研究表明地衣芽胞杆菌在适宜的水体生态条件下对饲料残饵中的蛋白质与淀粉降解率为 60%左右。

5. 存在问题及发展趋势

目前使用的芽胞杆菌并不是养殖品种本身具有的，而是外源添加的，使用这些菌种后，其在体内定殖、迅速扩增是芽胞杆菌在动物体内发挥作用的必要条件，但关于这方面的研究较少。芽胞杆菌在不同动物体内的增殖规律是否相同、在不同的生理环境下产生的酶类是否一致也未有研究报道。芽胞杆菌对宿主的内分泌系统的影响目前尚不清楚。已有的文献报道，芽胞杆菌在畜禽和水产养殖中应用时，都以活菌的形式或者芽胞形态添加饲喂，但其生产过程中制剂中存有大量死菌和代谢废物，这些对宿主动物机体的影响有待进一步研究确定。虽然许多科学研究证实芽胞杆菌的使用有利于提高养殖动物的免疫能力，提升养殖生产的综合效益，但不同种类的微生物所使用的环境不同，使用时要充分考虑具体环境。在水产养殖生产中，使用芽胞杆菌制剂等微生态制剂时，要充分

考虑水体环境中其他相关因子的影响，如水体消毒、口服抗生素等。从不同角度、生产流程、实际情况等因素考虑，科学运用微生态调控技术，建立有效方案，达到减少水产养殖动物疾病发生、保障水产品质量安全、降低水产养殖对环境的污染的目的，保证水产养殖可持续发展。

芽胞杆菌防治动物病害、促进生长有很多成功的例子，目前主要手段是利用芽胞纯品或粗制品。对芽胞杆菌产生的多种抗菌物质如脂肽类、肽类、磷脂类、类噬菌体颗粒、细菌素等的分离纯化应用较少。分离纯化利用这类抗菌物质，特别是拮抗蛋白质类物质一直是有关科研的主要研究课题之一。地衣芽胞杆菌是当前研究的热点，尤其是将其与分子生物学技术相结合。目前已经克隆了一些酶基因，如地衣芽胞杆菌中耐高温 α-淀粉酶基因、角蛋白酶基因 *kerB* 等，研究有待进一步深入。目前已有高产蛋白酶的地衣芽胞杆菌工程菌报道，但稳定性较差制约了其应用，有待进一步研究完善。地衣芽胞杆菌其他基因的克隆研究就更少了，克隆产抗菌蛋白基因，将其应用于抗病育种，可能是水产养殖乃至整个大农业防治病害的另外一条有效的途径。

第二节　芽胞杆菌产酶特性测定方法

一、概述

从 1989～2013 年，中国科学家对芽胞杆菌的酶类进行了系统的研究。芽胞杆菌酶类非常丰富，包括甾酮脱氢酶、烯醇丙酮酰莽草酸磷酸合酶、磷酸葡萄糖酸脱氢酶、ATP 酶、葡萄糖苷酶、乙酰乳酸脱羧酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、半乳糖苷酶、甘露聚糖酶、环状糊精葡萄糖基转移酶、内酰胺酶、葡萄糖苷酶、谷氨酰转肽酶、氨肽酶、半乳糖苷酶、苯丙氨酸脱氨酶、草酸脱羧酶、超氧化物歧化酶、胆固醇降解酶、胆固醇氧化酶、蛋白酶、蛋清溶菌酶、淀粉酶、豆豉纤溶酶、豆凝乳酶、对硫磷水解酶、甘油脱水酶、高丝氨酸内酯酶、谷氨酸脱羧酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺酶、谷氨酰胺转氨酶、谷胱甘肽转移酶、果胶酶、果糖基转移酶、过氧化氢酶、褐藻胶裂解酶、琥珀酸脱氢酶、环糊精酶、几丁质酶、甲基转移酶、胶原酶、角蛋白酶、角质酶、精氨酸酶、菊糖酶、聚半乳糖醛酸酶、壳聚糖酶、醌氧化还原酶、酪氨酸酶、邻苯二酚双加氧酶、磷酸酶、尿激酶、尿酸酶、脲酶、凝乳酶、凝血酶、苹果酸脱氢酶、葡甘聚糖酶、普鲁兰酶、漆酶、溶菌酶、溶栓酶、乳酸脱氢酶、乳糖酶、山梨糖脱氢酶、糖化酶、天冬氨酸激酶、纤维素酶、乙醛脱氢酶、乙酰乳酸脱羧酶、脂肪酶、植酸酶、酯酶等 78 个酶类。为了挖掘芽胞杆菌酶类的应用，本节选择一些应用上经常使用的酶类，对其酶活性的测定方法进行描述。

二、产酶特性分析芽胞杆菌来源

1. 产酶特性普查芽胞杆菌来源

为普查芽胞杆菌产酶特性，产酶特性普查芽胞杆菌来源于福建省农业科学院农业生物资源研究所保存的菌株（表 2-4），选择芽胞杆菌 14 个种的 41 个菌株，包括地衣芽

胞杆菌（*B. licheniformis*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）、多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）、蜂房类芽胞杆菌（*B. alvei*）、浸麻类芽胞杆菌（*P. macerans*）、巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、苛求芽胞杆菌（*B. fastidiosus*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）、球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）、苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）、圆孢芽胞杆菌（*B. globisporus*）、中胞短芽胞杆菌（*B. centrosporus*）等，进行 10 种酶，即淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、漆酶、脂肪酶、溶菌酶、普鲁兰酶、几丁质酶的普查。分析芽胞杆菌产酶的特性和各种酶类的相关性。

表 2-4　产酶特性普查芽胞杆菌来源

	芽胞杆菌种类	菌株编号
1	地衣芽胞杆菌	201
2	地衣芽胞杆菌	276
3	地衣芽胞杆菌	277
4	短小芽胞杆菌	705
5	多粘类芽胞杆菌	740
6	多粘类芽胞杆菌	526
7	多粘类芽胞杆菌	527
8	多粘类芽胞杆菌	528
9	多粘类芽胞杆菌	6-man
10	蜂房类芽胞杆菌	270
11	浸麻类芽胞杆菌	202
12	巨大芽胞杆菌	543（09.07.12）
13	巨大芽胞杆菌	544
14	巨大芽胞杆菌	706（2009.7.1）
15	苛求芽胞杆菌	273
16	枯草芽胞杆菌	4（BM1-4）
17	枯草芽胞杆菌	523
18	枯草芽胞杆菌	524
19	枯草芽胞杆菌	525
20	枯草芽胞杆菌	5447
21	蜡状芽胞杆菌	559
22	蜡状芽胞杆菌	560
23	蜡状芽胞杆菌	615
24	蜡状芽胞杆菌	7（3M1-13）
25	蜡状芽胞杆菌	704
26	凝结芽胞杆菌	519
27	球形赖氨酸芽胞杆菌	532

续表

	芽胞杆菌种类	菌株编号
28	球形赖氨酸芽胞杆菌	533
29	球形赖氨酸芽胞杆菌	534
30	球形赖氨酸芽胞杆菌	535
31	球形赖氨酸芽胞杆菌	752
32	苏云金芽胞杆菌	12（32）
33	苏云金芽胞杆菌	25
34	苏云金芽胞杆菌	26（Xs115）
35	苏云金芽胞杆菌	31
36	苏云金芽胞杆菌	340
37	苏云金芽胞杆菌	38
38	苏云金芽胞杆菌	521
39	苏云金芽胞杆菌	702
40	圆孢芽胞杆菌	518
41	中胞短芽胞杆菌	522

2. 酶学特性分析芽胞杆菌来源

供试菌株为 120 株芽胞杆菌，包括 7 个属 120 个种，来自于德国、瑞典、美国、中国等菌种保存中心，保存于福建省农业科学院农业生物资源研究所农业微生物研究中心的菌种资源库（表 2-5）。芽胞杆菌 7 个属分别为硫胺素芽胞杆菌（*Aneurinibacillus*）、芽胞杆菌（*Bacillus*）、短芽胞杆菌（*Brevibacillus*）、地芽胞杆菌（*Geobacillus*）、类芽胞杆菌（*Paenibacillus*）、枝芽胞杆菌（*Virgibacillus*）和 *Viridibacillus*，116 个种（其中包含枯草芽胞杆菌 3 个亚种），对 7 种酶，即淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、普鲁兰酶、几丁质酶、植酸酶等进行酶学特性研究。

表 2-5　芽胞杆菌产蛋白酶实验菌株

菌株编号	种类学名	中文名称	菌株来源
FJAT-10004	1 *A. aneurinilyticus*	解硫胺素芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14205	2 *A. migulanus*	米氏解硫胺素芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14209	3 *B. acidiproducens*	产酸芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10013	4 *B. agaradhaerens*	黏琼脂芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10025	5 *B. altitudinis*	高地芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10027	6 *B. arsenicus*	砷芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14220	7 *B. aryabhattai*	阿氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8755	8 *B. atrophaeus*	深褐芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8756	9 *B. azotoformans*	产氮芽胞杆菌	CCUG

续表

菌株编号	种类学名	中文名称	菌株来源
FJAT-8757	10 *B. badius*	栗褐芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10042	11 *B. barbaricus*	奇异芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10043	12 *B. bataviensis*	巴达维亚芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14214	13 *B. beijingensis*	北京芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8758	14 *B. benzoevorans*	食苯芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14236	15 *B. butanolivorans*	食丁酸芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10029	16 *B. carboniphilus*	嗜碳芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14215	17 *B. cecembensis*	科研中心芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8760	18 *B. cereus*	蜡状芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8761	19 *B. circulans*	环状芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8762	20 *B. clausii*	克劳氏芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8763	21 *B. coagulans*	凝结芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10017	22 *B. cohnii*	科氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14222	23 *B. decisifrondis*	腐叶芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10010	24 *B. endophyticus*	内生芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10030	25 *B. farraginis*	混料芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8764	26 *B. firmus*	坚强芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8765	27 *B. flexus*	弯曲芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10032	28 *B. fordii*	福氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10033	29 *B. fortis*	强壮芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10012	30 *B. funiculus*	绳索状芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8766	31 *L. fusiformis*	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14239	32 *B. galliciensis*	加利西亚芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10035	33 *B. gelatini*	明胶芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14270	34 *B. ginsengihumi*	人参土芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10036	35 *B. globisporus*	圆孢芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10022	36 *B. halmapalus*	盐敏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10024	37 *B. halodurans*	耐盐芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10037	38 *B. hemicellulosilyticus*	解半纤维素芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14233	39 *B. horikoshii*	堀越氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10049	40 *B. horti*	花园芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14211	41 *B. humi*	土地芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14247	42 *B. hwajinpoensis*	花津滩芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14212	43 *B. indicus*	印度芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8767	44 *B. insolitus*	异常芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14252	45 *B. isronensis*	印空研芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14210	46 *B. koreensis*	韩国芽胞杆菌	DSMZ

续表

菌株编号	种类学名	中文名称	菌株来源
FJAT-14240	47 *B. kribbensis*	韩研所芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8769	48 *B. laevolacticus*	右旋乳酸芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14213	49 *B. lehensis*	列城芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8770	50 *B. lentus*	迟缓芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8771	51 *B. licheniformis*	地衣芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14234	52 *B. litoralis*	岸滨芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14206	53 *B. luciferensis*	坎德玛斯岛芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14207	54 *B. macauensis*	澳门芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14248	55 *B. macyae*	马氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8772	56 *B. marinus*	海洋芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14235	57 *B. marisflavi*	黄海芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8773	58 *B. massiliensis*	马塞芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8774	59 *B. megatherium*	巨大芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14219	60 *B. methanolicus*	甲醇芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14249	61 *B. methanolicus*	甲醇芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10005	62 *B. mojavensis*	莫哈维芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14208	63 *B. muralis*	壁芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14258	64 *B. murimartini*	马丁教堂芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8775	65 *B. mycoides*	蕈状芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14216	66 *B. nealsonii*	尼氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14202	67 *B. niacini*	烟酸芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14223	68 *B. novalis*	休闲地芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14201	69 *L. odysseyi*	奥德赛赖氨酸芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14224	70 *B. oleronius*	蔬菜芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8776	71 *B. pasteurii*	巴氏芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14237	72 *B. pseudofirmus*	假坚强芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14225	73 *B. pseudomycoides*	假真菌样芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8777	74 *B. psychrophilus*	冷解糖芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8778	75 *B. psychrosaccharolyticus*	冷解糖芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8779	76 *B. pumilus*	短小芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14260	77 *B. safensis*	沙福芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8780	78 *B. schlegelii*	施氏芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14262	79 *B. selenatarsenatis*	硒砷芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14261	80 *B. selenitireducens*	还原硒酸盐芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14231	81 *B. seohaeanensis*	西岸芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14257	82 *B. shackletonii*	沙氏芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8781	83 *B. simplex*	简单芽胞杆菌	CCUG

续表

菌株编号	种类学名	中文名称	菌株来源
FJAT-8782	84 *B. smithii*	史氏芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14232	85 *B. soli*	土壤芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14256	86 *B. sonorensis*	索诺拉沙漠芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8783	87 *L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌	CCUG
FJAT-14271	88 *B. subterraneus*	地下芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14251	89 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*	枯草芽胞杆菌因氏亚种	DSMZ
FJAT-8784	90 *B. subtilis* subsp. *spizizenii*	枯草芽胞杆菌斯氏亚种	CCUG
FJAT-14254	91 *B. subtilis* subsp. *subtilis*	枯草芽胞杆菌枯草亚种	DSMZ
FJAT-14253	92 *B. taeanensis*	大安芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8787	93 *B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8788	94 *B. velezensis*	贝莱斯芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8789	95 *B. xerothermodurans*	抗干热芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8790	96 *B. agri*	土壤短芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10018	97 *B. agri*	土壤短芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10006	98 *B. borstelensis*	波茨坦短芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8753	99 *B. brevis*	短短芽胞杆菌	CCUG
FJAT-8759	100 *B. centrosporus*	中孢短芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10008	101 *B. choshinensis*	铫子短芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10011	102 *B. formosus*	美丽短芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8768	103 *G. kaustophilus*	嗜热地芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10058	104 *G. thermodenitrificans*	热脱氮地芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8785	105 *G. thermoglucosidasius*	热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10001	106 *P. alginolyticus*	解藻酸类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10002	107 *P. alvei*	蜂房类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8754	108 *B. amyloliquefaciens*	解淀粉芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10003	109 *P. amylolyticus*	解淀粉芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10038	110 *P. chitinolyticus*	解几丁质类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10007	111 *P. chondroitinus*	软骨素类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10009	112 *P. curdlanolyticus*	解凝乳芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10020	113 *P. glucanolyticus*	解葡聚糖类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14203	114 *P. lautu*	灿烂类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-14204	115 *P. macerans*	浸麻类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10055	116 *P. polymyxa*	多粘类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-8786	117 *P. thiaminolyticus*	解硫胺素类芽胞杆菌	CCUG
FJAT-10021	118 *P. validus*	强壮类芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10053	119 *V. pantothenticus*	泛酸枝芽胞杆菌	DSMZ
FJAT-10028	120 *V. arvi*	田地绿芽胞杆菌	DSMZ

三、芽胞杆菌酶学特性分析材料

芽胞杆菌培养采用 LB 固体培养基，配方为：酵母提取物 10.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、琼脂粉 17g、水 1000ml，pH 7.0～7.2。LB 液体培养基：酵母提取物 10.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、水 1000ml，pH 7.0～7.2。液体发酵培养基，配方为干酪素 5.0g、酵母提取物 10.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 5.0g、KH_2PO_4 0.5g、K_2HPO_4 0.5g、水 1000ml，pH 7.0。

四、芽胞杆菌的培养与生长曲线测定

1. 培养方法

种子液制备，用无菌接菌环从活化的平板上挑取单菌落，接种到装有 LB 液体培养基的三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 的恒温摇床中培养 16h 即作为种子液。接种培养，用移液枪吸取 3ml 种子液（接种量为 2%）加入盛有 300ml 灭菌蛋白质液体发酵培养基三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。

2. 生长曲线与活菌数测定

1）生长曲线测定。分别在培养 0h、4h、8h、12h、16h、20h、24h、28h、32h、36h、40h、44h、48h、52h、56h、72h 时取出锥形瓶，于超净台内吸取菌液，按一定的倍数稀释，使待测样的 OD_{600} 值为 0.1～0.8，然后测稀释样品的吸光度，计算芽胞杆菌发酵液的吸光值。以时间为横坐标，OD_{600} 值为纵坐标绘制生长曲线。

2）活菌数测定。分别在培养 0h、4h、8h、12h、16h、20h、24h、28h、32h、36h、40h、44h、48h、52h、56h、72h 时取出锥形瓶，于超净工作台内吸取 1ml 的培养液，加入含有 9ml 无菌水的试管中稀释 10 倍，逐步稀释直到 10^{-7}。然后分别取 10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 的稀释液 100μl，加入 LB 固体培养基中涂布。把涂布完的培养基放入 30℃培养箱中培养，24h 后计数菌落个数。

五、芽胞杆菌酶学特性分析

1. 淀粉酶活性测定

（1）淀粉酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产淀粉酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。在菌落周围滴加卢戈氏碘液，卢戈氏碘液能与淀粉发生显色反应，若菌株能产淀粉酶，则使得菌落周围的淀粉被分解为单糖而出现透明圈，可以初步判断该菌是否产生淀粉酶。

试剂配制：①3,5-二硝基水杨酸（DNS）显色液，磷酸缓冲液（pH6.0）。②1%淀粉溶液，称取 1.0g 淀粉加入水中，加热溶解，加入 50ml 缓冲液，并用纯水定容至 100ml。

测定方法：芽胞杆菌活化，用移液枪吸取 20μl 于平板上划线，将平板置于 30℃恒温培养箱中培养 2～3d。液体培养，灭菌接种环挑取 1～2 个单菌落接种至盛有 20ml LB

液体培养基的锥形瓶中，在 30℃、170r/min 摇床中培养 1d，作为实验菌液。水解透明圈测定，用灭菌的牙签蘸取菌液，在培养基平板上轻轻扎 5 个点。将平板倒置，放于 30℃恒温培养箱中培养 3～4d。染色观察：往平板内加入适量的卢戈氏碘液，观察是否出现水解透明圈。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（*H*）、菌落直径（*C*），计算 *H*/*C* 值，并对平板进行拍照记录。

（2）淀粉酶活性测定方法

测定原理：淀粉经淀粉酶作用后生成葡萄糖、麦芽糖等小分子物质而被机体利用。淀粉酶主要包括 α-淀粉酶和 β-淀粉酶两种。α-淀粉酶可随机地作用于淀粉中的 α-1,4-糖苷键，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖，同时使淀粉的黏度降低，因此又称为液化酶。β-淀粉酶可从淀粉的非还原性末端进行水解，每次水解下一分子麦芽糖，又称为糖化酶。淀粉酶催化产生的这些还原糖（麦芽糖）能使 3,5-二硝基水杨酸还原，生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。其反应如图 2-2 所示。

图 2-2　淀粉酶活性测定原理

试剂配制：①标准麦芽糖溶液（1mg/ml），精确称取 100mg 麦芽糖，用蒸馏水溶解并定容至 100ml。②3,5-二硝基水杨酸试剂，精确称取 1g 3,5-二硝基水杨酸，溶于 20ml 2mol/L NaOH 溶液中，加入 50ml 蒸馏水，再加入 30g 酒石酸钾钠，待溶解后用蒸馏水定容至 100ml。盖紧瓶塞，勿使 CO_2 进入。若溶液混浊可过滤后使用。③0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液，A 液（0.1mol/L 柠檬酸），称取 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 21.01g，用蒸馏水溶解并定容至 1L；B 液（0.1mol/L 柠檬酸钠），称取 $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 29.41g，用蒸馏水溶解并定容至 1L；取 A 液 55ml 与 B 液 145ml 混匀，即为 0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液。④1%淀粉溶液，称取 1g 淀粉溶于 100ml 0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液中。

测定方法：粗酶液制备，发酵液培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，20min），收集发酵液上清液，适当稀释以备测定。淀粉酶活测定，淀粉活性测定步骤见表 2-6。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-6 次序向各试管加入试剂及酶液，并按表格步骤操作。

表 2-6　淀粉酶活测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	0.5	#	—	—
粗酶液/ml	—	0.5	0.5	0.5

续表

编号	1	2	3	4
沸水浴/min		5		
1%淀粉溶液/ml		2.5		
40℃水浴/min		30		
沸水浴/min		10		
DNS 溶液/ml		2.5		
沸水浴/min		10		
定容/ml		20		
OD_{520}值				

标准曲线：淀粉酶活性的大小与产生的还原糖（麦芽糖）的量成正比。用标准浓度的麦芽糖溶液制作标准曲线，用比色法测定淀粉酶作用于淀粉后生成的还原糖的量，以单位质量样品在一定时间内生成的麦芽糖的量表示酶活性。麦芽糖标准曲线测定，取 7 支 20ml 刻度的试管，按表 2-7 取试剂。在工作波长为 520nm 下，以纯水调零，测定各管的光密度值。以光密度值为纵坐标，麦芽糖浓度为横坐标，绘制出麦芽糖标准曲线图 2-3，得到麦芽糖标准曲线公式：y=1.5132x+0.0582，其 R^2=0.9989。

表 2-7　麦芽糖标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5	6
麦芽糖标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
麦芽糖质量/mg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
DNS/ml				2.5			
沸水浴/min				10			
定容/ml				20			
OD_{520}值	0.043	0.215	0.378	0.508	0.672	0.808	0.962

酶活计算：酶活性按国际单位规定，定义每 1ml 淀粉酶在 1min 内催化淀粉水解生成 1μg 的麦芽糖为一个酶活性单位 U（U/ml）。

$$U=\frac{2N\times B}{30}\times 1000 \tag{2-1}$$

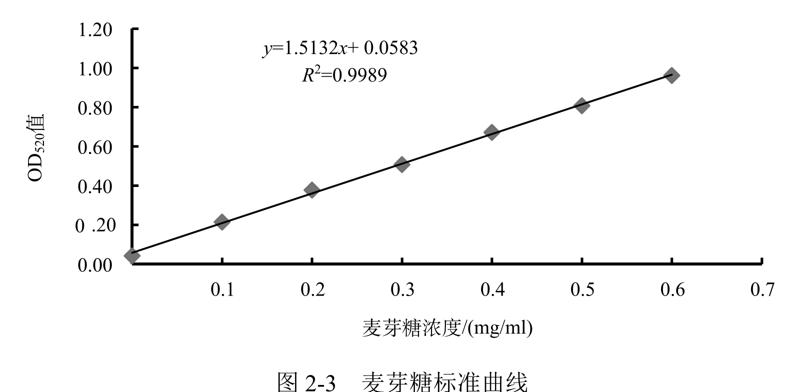


图 2-3　麦芽糖标准曲线

式中，U 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{520} 值所对应的麦芽糖的质量（mg），30 为反应时间 30min。

2. 芽胞杆菌蛋白酶活性测定

（1）蛋白酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产蛋白酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。在菌落周围滴加 5%三氯乙酸，三氯乙酸能使蛋白质发生变性，若菌株能产蛋白酶，则使得菌落周围的酪素分解而出现透明圈，便可以初步判断该菌是否产生蛋白酶。

测定方法：芽胞杆菌活化，用移液枪吸取 20μl 于平板上划线，将平板置于 30℃恒温培养箱中培养 1～2d。液体培养，灭菌接种环挑取 1～2 个单菌落接种至盛有 20ml LB 液体培养基的锥形瓶中，在 30℃、170r/min 摇床中培养 1d。水解透明圈测定，用灭菌的牙签蘸取菌液，在选择培养基平板上轻轻扎 5 个点。将平板倒置，放于 30℃恒温培养箱中培养 36h。染色观察，往平板中加入适量 5%的三氯乙酸溶液，静置 30min 弃去多余溶液，观察平板上是否出现透明圈。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（H）、菌落的直径（C），统计 H/C 值，作为蛋白酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）蛋白酶活性测定

测定原理：蛋白酶在一定的温度与 pH 条件下，水解底物，产生含有酚基的氨基酸（如酪氨酸、色氨酸等），在碱性条件下，将费林（Folin）试剂还原，生成钼蓝与钨蓝，用分光光度法测定，计算其酶活性。

试剂配制：费林试剂的配制。甲液：称取 69.28g 硫酸铜，用蒸馏水溶解后，定容至 1000ml；乙液：称取 346g 酒石酸钾钠溶于 500ml 蒸馏水中，另称取氢氧化钠 100g 溶于 200ml 蒸馏水中，将二者混合，定容至 1000ml。使用时，将甲液与乙液按 1∶1 比例混合后使用。

测定方法：以芽胞杆菌为例，用移液枪吸取 2ml 种子液（2%的接种量）加入盛有 100ml 灭菌发酵培养基的 250ml 三角瓶中。将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，20min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-8 次序向各试管中加入试剂及酶液，

并按表格步骤操作。

表 2-8　蛋白酶活测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	1	1	1	1
10%的 TCA/ml	3	#	#	#
0.5%酪素/ml		2		
40℃水浴/min		10		
离心		6000 r/min 15 min		
滤液/μl		600		
0.55mol/L Na_2CO_3/ml		5		
费林试剂/ml		1		
30℃保温/min		15		
OD_{680} 值				

标准曲线：L-酪氨酸标准曲线的测定方法，取 7 支 25ml 刻度试管，按表 2-9 加入试剂，在工作波长为 680nm 下，以纯水调零，测定各管的吸光度。以 OD 值为纵坐标，L-酪氨酸浓度为横坐标，绘制出 L-酪氨酸标准曲线（图 2-4），OD_{680} 值与蛋白酶活显现线性关系，线性方程为 y=3.6429x+0.003，R^2=0.9976。

表 2-9　L-酪氨酸标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5	6
L-酪氨酸标准液/μl	0	40	80	120	160	200	240
L-酪氨酸质量/μg	0	40	80	120	160	200	240
Na_2CO_3 溶液/ml				5			
费林试剂/ml				1			
30℃保温/min				10			
定容/ml				20			
OD_{680} 值	0.000	0.068	0.157	0.222	0.305	0.369	0.430

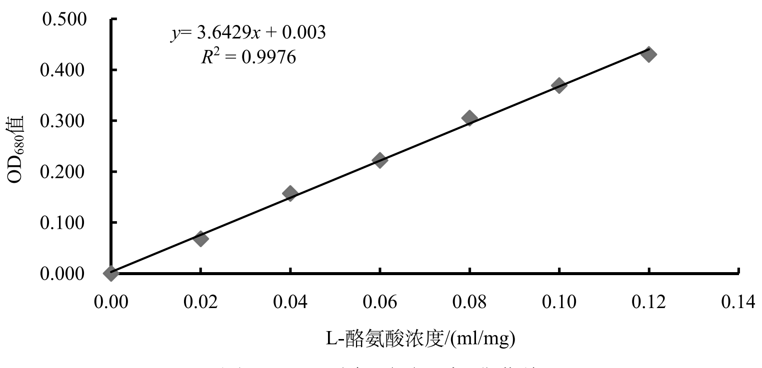


图 2-4　L-酪氨酸酶活标准曲线

酶活计算：酶活性按国际单位规定：定义每 1ml 蛋白酶在 1min 内催化酪素水解生成 1μg 的 L-酪氨酸为一个酶活性单位 U（U/ml）。

$$U = \frac{N \times B}{30 \times 0.1} \times 1000 \tag{2-2}$$

式中，U 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{680} 值所对应的 L-酪氨酸的量（μg），30 为反应时间 30min。

3. 芽胞杆菌脂肪酶活性测定

（1）脂肪酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产脂肪酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。由于溴甲酚紫作为 pH 指示剂，其变色区域为 pH5.2（黄色）～6.8（紫色），若菌株能够产生脂肪酶，则分解利用菌落周围的脂肪产生脂肪酸，使菌落周围的 pH 改变，故观察菌落周围是否出现橙黄色变色圈，便可以初步判断该菌是否产生脂肪酶。

测量统计：用游标卡尺测定变色圈直径（H）、菌落的直径（C），统计 H/C 值，作为脂肪酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）脂肪酶活性测定

测定原理：脂肪酶在一定条件下，能使甘油三酯水解成脂肪酸、甘油二酯、甘油单酯和甘油，所释放的脂肪酸可用标准碱溶液进行中和滴定，用 pH 计或酚酞指示反应终点，根据消耗的碱量，计算其酶活性。脂肪酶催化的反应是：甘油三酯+水→甘油二酯+游离脂肪酸→甘油单酯+游离脂肪酸→甘油+游离脂肪酸。脂肪酶只能在异相系统，即在油-水界面上作用，对水溶性底物无作用，这一点在有机合成中合成手性中间体方面具有很多的优越性。1g 固体酶粉（或 1ml 液体酶），在一定温度的 pH 条件下，1min 水解底物产生 1μmol 的可滴定的脂肪酸，即为一个酶活性单位，以 U/g（U/ml）表示。反应式为：RCOOH+NaOH→RCOONa+H_2O。

试剂配制：①95%乙醇。②4%聚乙烯醇（PVA，聚合度 1750±50），称取 4g PVA，加蒸馏水 80ml，沸水中加热，并不断搅拌，使其完全溶解，慢速搅拌，以免产生过多气泡，冷却后定容至 100ml，用双层纱布过滤后备用。③pH7.5 磷酸缓冲液：称取十二水磷

酸氢二钠 39.62g，磷酸二氢钾 1.96g，用水溶解并定容至 500ml，调节溶液的 pH 到 7.5±0.05。④0.05mol/L 氢氧化钠按 GB/T 601 配制与标定，使用时稀释 10 倍。⑤10g/L 酚酞指示液，按 GB/T 603 配制。

测定方法：①电位滴定法，Ⅰ.按 pH 计使用说明书进行仪器校正，Ⅱ.取两个 100ml 烧杯，分别作为空白 A 和样品 B，分别加入底物溶液 4ml 和缓冲液 5ml，再于 A 中加入 95%乙醇 15.00ml，于 40℃±0.2℃水浴中预热 5min，然后各加 1ml 酶液，立即混匀计时，准确反应 15min 后，于 B 中立即补加 15.00ml 95%乙醇终止反应，取出。Ⅲ.在烧杯中加入一转子，置于电磁搅拌器上，边搅拌边用氢氧化钠标准溶液滴定，至 pH10.3，为滴定终点，记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积。②指示剂滴定法，Ⅰ.取两个 100ml 三角瓶，分别作为空白 A 和样品 B，分别加入底物溶液 4ml 和缓冲液 5ml，再于 A 中加入 95%乙醇 15.00ml，于 40℃±0.2℃水浴中预热 5min，然后各加 1ml 酶液，立即混匀计时，准确反应 15min 后，于 B 中立即补加 15.00ml 95%乙醇终止反应，取出。Ⅱ.于 A、B 瓶中各滴加酚酞两滴，用氢氧化钠标准溶液滴定，直至显示微红色并保持 30s 不褪色为滴定终点，记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积。

酶活计算：脂肪酶制剂的酶活性按以下公式计算：

$$X_1=\frac{(V_1-V_2)\times c\times 50\times n_1}{0.05}\times\frac{1}{15} \tag{2-3}$$

式中，X_1 为样品的酶活性（U/g）；V_1 为滴定样品时消耗氢氧化钠标准溶液的体积（ml）；V_2 为滴定空白时消耗氢氧化钠标准溶液的体积（ml）；c 为氢氧化钠标准溶液（mol/L）；50 为 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 1.00ml 相当于脂肪酸 50μmol；n_1 为样品的稀释倍数；0.05 为氢氧化钠标准溶液浓度换算系数；15 为反应时间 15min，以 1min 计算。

影响脂肪酶测定结果有很多因素，其中底物、反应温度和 pH 因素影响最大。在滴定法中，以前国外有报道测定脂肪酶酶活时，不将底物制成乳化液，直接在搅拌状态下对油脂进行酶解反应，然后用碱滴定生成的脂肪酸。不乳化测得的结果平行性较差，这可能是反应过程中的随机误差引起的。因为不乳化时，反应体系是酶的水溶液加入底物橄榄油中，水与油是互不相溶的，必然造成体系的不均匀，酶不能与底物充分接触，反应不完全，因此测定的平行性较差，可比性也差。酶都有其最适的反应温度，在不同温度下酶所表现的活性也不同，温度的升高可以加快反应速度，但会引起酶蛋白变性失活。同一浓度的碱性脂肪酶在相同的温度下，对同样的底物作用，在不同的 pH 环境中，所测得的酶活也不同。

4. 芽胞杆菌纤维素酶活性测定

（1）纤维素酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产纤维素酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。在菌落周围滴加卢戈氏碘液，卢戈氏碘液能与多糖发生显色反应，若菌株能产纤维素酶，则使得菌落周围的纤维素被分解为单糖而出现透明圈。测定并记录透明圈与菌落直径的比值，便可以初步判断该菌是否产生纤维素酶。

测定方法：以芽胞杆菌为例，用灭菌的牙签蘸取菌液，在选择培养基平板上轻轻扎

3 个点。将平板倒置，放于 30℃恒温培养箱中培养 3～4d。往平板中加入适量 1mg/ml 的刚果红染液，染色 10min；弃去染液，加入适量的 1mol/L 的 NaCl 溶液，洗涤 10min，观察是否有透明圈出现。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（*H*）、菌落的直径（*C*），统计 *H*/*C* 值，作为纤维素酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）纤维素酶活性测定

测定原理：纤维素酶是一种复合酶。酶系包括外切 β-1,4-葡聚糖酶（Exo β-1,4glucanase，EC3.2.1.9）、内切 β-1,4-葡聚糖酶（Endo β-1,4-glucanase，EC1.2.1.4）和纤维二糖酶。纤维素酶在一定温度和 pH 条件下，将纤维素酶底物（滤纸或羧甲基纤维素钠）水解，释放出还原糖。在碱性、煮沸条件下，3,5-二硝基水杨酸（DNS 试剂）与还原糖发生显色反应，其颜色的深浅与还原糖（与葡萄糖汁）含量成正比。通过在 540nm 测定吸光度，可得到产生还原糖的量，计算出纤维素酶的 FPA 酶和 CMCA 酶活性，以此代表纤维素酶的酶活性。

试剂配制：①羧甲基纤维素钠液体发酵培养基，羧甲基纤维素钠（CMC-Na）10.0g、酵母提取物 10.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、水 1000ml，分装后分别用酸或碱液将 pH 调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0。②3,5-二硝基水杨酸（DNS）显色液，准确称取 6.3g 3,5-二硝基水杨酸置于 2mol/L NaOH 262ml 溶液中，然后加酒石酸钾钠的热溶液（182.0g 酒石酸钾钠溶于 500ml 水中），再加入 5.0g 苯酚和 5.0g 亚硫酸钠，搅拌至溶解，冷却后定容至 1000ml，装于棕色瓶中备用。③柠檬酸缓冲液（pH5.0），制取 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 溶液（称取 7.16g 磷酸氢二钠溶解于纯水中，定容至 100ml）和 0.1mol/L 的柠檬酸溶液（称取 2.1g 柠檬酸溶解于纯水中，定容至 100ml），取磷酸氢二钠溶液 24.3ml、柠檬酸溶液 25.7ml 混匀，再定容至 100ml。④羧甲基纤维素钠溶液，称取 2.0g CMC-Na 溶于 200ml 水中，沸水浴中加热至溶解后冷却过滤，取滤液 100ml，加柠檬酸缓冲液 20ml、纯水 40ml，混匀，储存备用（一星期后重配）。⑤标准葡萄糖溶液（1.00mg/ml），称取干燥至恒重的葡萄糖 100mg，溶解后定容至 100ml，置于冰箱中备用。

标准曲线：以芽胞杆菌为例，测定葡萄糖标准曲线，取 7 支 20ml 刻度试管，按表 2-10 取试剂，在工作波长为 540nm 下，以纯水调零，测定各管的 OD_{540}。以 OD_{540} 为纵坐标，葡萄糖浓度为横坐标，绘制出葡萄糖标准曲线（图 2-5），得到葡萄糖标准曲线公式：$y=0.6176x+0.0033$，其中 $R^2=0.9979$。

表 2-10　葡萄糖标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
葡萄糖浓度/（mg/ml）	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
DNS/ml				3			
沸水浴/min				10			
定容/ml				20			
OD_{540} 值	0.022	0.136	0.309	0.476	0.635	0.819	0.966

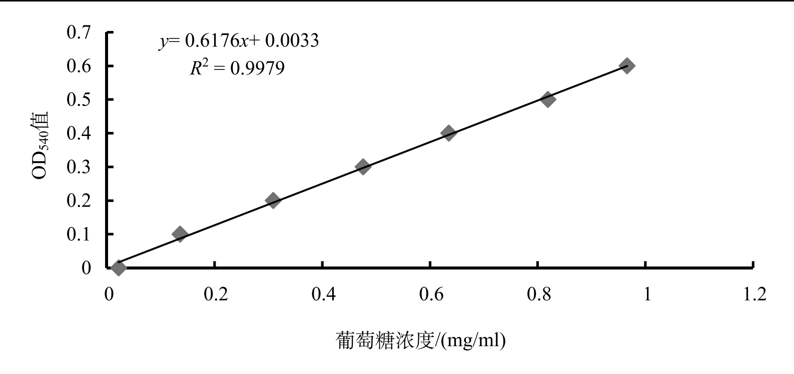


图 2-5　葡萄糖标准曲线

测定方法：以芽胞杆菌为例，测定纤维素酶对底物羧甲基纤维素钠的水解产生葡萄糖的能力，计算出纤维素的活性。粗酶液制备，发酵液培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，20min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-11 次序向各试管加入试剂及酶液，并按表格步骤操作，读出羧甲基纤维素钠在芽胞杆菌作用下生成葡萄糖量相应的 OD_{540} 值，计算酶活。

表 2-11　纤维素酶活测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	1	—	—	—
沸水浴/min	5			
粗酶液/ml	—	1	1	1
CMC-Na 溶液/ml	3			
50℃水浴/min	30			
沸水浴/min	10			
DNS 溶液/ml	3			
沸水浴/min	10			
定容/ml	25			
OD_{540}值				

酶活计算：纤维素酶活性按国际单位规定，定义每毫升纤维素酶在 1min 内催化羧甲基纤维素钠水解生成 1μg 的葡萄糖为一个酶活性单位 U（U/ml）。

$$U_{\mathrm{CMC}}=\frac{N\times B}{30\times 1} \tag{2-4}$$

式中，U_{CMC} 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{540} 值所对应的葡萄糖的量（μg），30 为反应时间 30min。

5. 芽胞杆菌木聚糖酶活性测定

（1）木聚糖酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产木聚糖酶筛选培养基上，37℃

倒置培养 48h。在培养基上加入无水乙醇，静置 2～3h，无水乙醇能使多糖发生显色反应，若菌株能产木聚糖酶，则使得菌落周围的木聚糖被分解为单糖而出现透明圈，便可以初步判断该菌是否产生木聚糖酶。

测定方法：以芽胞杆菌为例，从菌种库中取出需要活化的菌株在 LB 平板上划线培养 30℃、2d。种子液制备，在平板上挑取菌落，接种在 LB 液体培养基中 30℃、1d。发酵液用移液枪取 400μl 种子液加入到 20ml 发酵液培养基中。放在 30℃、170r/min 恒温摇床里发酵培养 3d。粗酶液制备，取发酵培养液 2ml，10 000r/min、4℃离心 10min，上清液为粗酶液放 4℃冰箱备用。打孔培养基，取 20ml 木聚糖培养基（木聚糖 5.0g、琼脂 15～20g、水 1000ml，pH7.0）倒入培养皿中，用 7mm 直径的打孔器在固体培养基中打 3 个孔。每种粗酶液做 3 个平行，每个孔加入 90μl 粗酶液；放 37℃培养箱培养 5h。往培养皿中加入适量乙醇，浸泡 3h，产木聚糖酶菌落周围出现明显的透明圈。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（H）、菌落的直径（C），统计 H/C 值，作为蛋白酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）木聚糖酶活性测定

测定原理：芽胞杆菌木聚糖酶能将木聚糖降解成寡糖和单糖。还原性寡糖和单糖在沸水浴条件下可以与 3,5-二硝基水杨酸（DNS）试剂发生显色反应。反应液颜色的深度与酶解产生的还原糖量成正比，而还原糖的生成量又与反应液中木聚糖酶的活力成正比。因此，通过分光比色测定反应液颜色的强度，可以计算反应液中木聚糖酶的活力。

试剂配制：①木聚糖酶液体发酵培养基，木聚糖 4.0g、酵母提取物 5.0g、NaCl 2.0g、NH_4NO_3 2.0g、K_2HPO_4 1.0g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5g、水 1000ml，pH7.0。②3,5-二硝基水杨酸（DNS）显色液，准确称取 6.3g 3,5-二硝基水杨酸置于 2mol/L 氢氧化钠 262ml 溶液中，然后加酒石酸钾钠的热溶液（182.0g 酒石酸钾钠溶于 500ml 水中），再加入 5.0g 苯酚和 5.0g 亚硫酸钠，搅拌至溶解，冷却后定容至 1000ml，装于棕色瓶中备用。③磷酸缓冲液（pH6.6），0.2mol/L Na_2HPO_4 37.5ml，0.2mol/L NaH_2PO_4 62.5ml。④1%木聚糖底物，称取 1.0g 木聚糖加入水中，加热溶解，加入 100ml 磷酸缓冲液（现配现用）。⑤标准木糖溶液（1.00mg/ml）：称取干燥至恒重的木糖 100mg，溶解后定容至 100ml，置于冰箱中备用。

标准曲线：取 7 支 20ml 刻度试管，按表 2-12 取试剂，在工作波长为 540nm 下，以水对照调零，测定各管的 OD 值。以 OD 值为纵坐标，木聚糖浓度为横坐标，绘制出木糖标准曲线（图 2-6），得到木聚糖标准曲线公式：y=0.6855x+0.0241，其中 R^2=0.9968。

表 2-12　木聚糖标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5	6
木聚糖标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
木糖质量/mg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
DNS/ml				3			
沸水浴/min				15			
定容/ml				20			
OD_{540} 值	0.0513	0.1392	0.2851	0.4284	0.5750	0.7247	0.8440

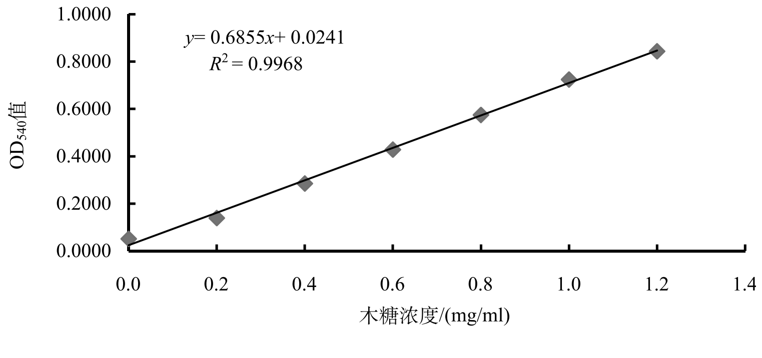


图 2-6　木聚糖标准曲线

测定方法：以芽胞杆菌为例，种子液制备，用无菌接菌环从活化的平板上挑取单菌落，接种到装有 LB 液体培养基的三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 的恒温摇床中培养 16h 即作为种子液。接种培养及木聚糖酶的提取，用移液枪吸取 1ml 种子液（2%的接种量）加入盛有 50ml 灭菌发酵培养基的 250ml 三角瓶。将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，10min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-13 次序向各试管加入试剂及酶液，并按步骤操作。

表 2-13　木聚糖活性测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	1	—	—	—
沸水浴/min	5			
粗酶液/ml	—	1	1	1
1%木聚糖溶液/ml	1			
50℃水浴/min	10			
沸水浴/min	10			
DNS 溶液/ml	3			
沸水浴/min	15			
定容/ml	20			
OD_{540}值				

酶活计算：酶活性按国际单位规定，定义是在 pH 6.6、温度为 50℃的条件下，每 1ml 木聚糖酶在 1min 内催化木聚糖水解生成 1μg 的木糖为一个酶活性单位 U（U/ml）。

$$U = \frac{N \times B}{t \times 1} \times 1000 \tag{2-5}$$

式中，U 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{540} 值所对应的麦芽糖的质量（μg）；t 为反应时间（min）。

6. 芽胞杆菌漆酶活性测定

（1）漆酶红色氧化带测定

将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产漆酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。漆酶能将愈创木酚氧化而产生红色氧化带。观察菌落周围是否出现红色氧化带，测定并记录氧化带与菌落直径的比值，便可以初步判断该菌是否产生漆酶。

（2）漆酶活性测定

测定原理：ABTS 的最大吸收峰在 340nm，ABTS 的阳离子自由基的最大吸收峰在 415nm。由此推断，在 ABTS 的溶液中含有极少的 ABTS 阳离子自由基，它们在更强的还原剂作用下被还原为 ABTS。以 ABTS 为底物进行漆酶的定量分析，通常在 420nm 下测定 3min 内吸光度的变化。用这种底物进行定量分析有一个缺点，即 ABTS 阳离子自由基溶液的吸光度受溶液中未反应的 ABTS 浓度的影响。这就产生了一个问题：420nm 下的摩尔吸光系数 36 000L/（mol·cm）是在纯 ABTS 阳离子自由基的条件下求得的，而在实际测定反应中，ABTS 是过量的，这就导致人们低估了酶活。这种影响不能忽视，因为反应终止时，溶液中至少还要有 1mmol/L 的 ABTS。尽管用 ABTS 为底物存在上述问题，但是它仍是漆酶活性测定的最佳底物之一。一般以 ABTS 为底物，采用 Glycine-HCl 缓冲体系、乙酸二乙酸钠缓冲体系或柠檬酸盐二磷酸盐缓冲体系。如果菌种产生过氧化氢，为了准确测定，需加入一定量的过氧化氢酶，用以破坏过氧化氢。因为在代谢过程中，菌体自身产生过氧化氢可激发木质素过氧化物酶与锰过氧化物酶对 ABTS 的氧化。

试剂配制：①1mmol/L ABTS 溶液，ABTS 为美国 Sigma 公司产品，精确称取 0.0274g ABTS，用蒸馏水定容至 100ml，置于棕色瓶备用。②HAc-NaAc（pH4.5）缓冲溶液，18g NaAc，9.8ml HAc，用蒸馏水定容至 1L，用 pH 计校准其 pH。

测定方法：取酶液 0.1ml，加入 HAc-NaAc（pH4.5）缓冲液 2.5ml，混匀，加入 ABTS 0.4ml，放置 30s，每 15s 读取一次 420nm 下吸光值，共读取 6～7 个数值。以经验判断，若吸光值增长迅速，则将酶液稀释 2～5 倍再次测定，直至吸光值数值变化不是太快，且数值均为 0.2～0.8。

酶活计算：吸光度变化的斜率×4000×稀释倍数。

7. 芽胞杆菌溶菌酶活性测定

（1）溶菌酶水解透明圈测定

将溶壁微球菌（*Micrococcus lysoleikticus*）在牛肉膏-蛋白胨培养基上活化 24h 后，划两环接种于牛肉膏-蛋白胨液体培养基 180r/min 摇床培养 24h，吸取 200μl 的菌液涂布于牛肉膏-蛋白胨平板上。待平板上的菌液干后，将待测菌株点种于涂有溶壁微球菌的牛肉膏-蛋白胨培养基上，37℃倒置培养 48h。若菌落周围产生抑菌圈，测定并记录透明圈与菌落直径的比值，便可以初步判断该菌是否产生溶菌酶。

（2）溶菌酶活性测定

准确称取溶菌酶标准品，用 pH6.4、1/15mol/L PBS 配成 1μg/ml，临用时用 PBS 稀释成 500μg/ml、100μg/ml、50μg/ml、25μg/ml、10μg/ml 标准液，用以制成标准曲线。以

溶壁微球菌冻干粉为底物，用 1/15mol/L、pH6.4 磷酸缓冲液配成一定浓度的悬浊液（用 722 型分光光度计于 640nm 测定并调整其浓度为透光率达 30%～40%）。OD_{530}=0.3，菌浓度为 4×10^6CFU/ml。取 0.1ml 血清于小试管中，置 28℃水浴锅中预热 5min，然后加入 1.8ml 已预热的菌液，立即计时，至 2min 时加入 2 滴 5mol/L KOH 溶液以终止反应，立即用 0.5cm 比色杯于 640nm 波长测其透光率 T1%。取同样血清 0.1ml 1 滴于 5mol/L 的 KOH 溶液中摇匀，28℃预热 5min 后加入 1.8ml 已预热的菌液，在同样温度下至 2min 时同法测定其透光率 T0%。T1%–T0%为透光率差值，即溶菌酶所致透光率的变化。再从标准曲线上可查血清中溶菌酶含量。

8. 芽胞杆菌普鲁兰酶活性测定

（1）普鲁兰酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产普鲁兰酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。在培养基上加入无水乙醇，静置 2～3h，无水乙醇能使多糖发生显色反应，若菌株能产普鲁兰酶，则使得菌落周围的普鲁兰糖被分解为单糖而出现透明圈。测定并记录透明圈与菌落直径的比值，便可以初步判断该菌是否产生普鲁兰酶。

试剂配制：选择培养基，普鲁兰多糖 4.0g、酵母提取物 10.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、琼脂 15～20g、水 1000ml，pH7.0。

测定方法：从菌种库中取出需要活化的菌株在 LB 平板上划线培养 30℃、2d。种子液制备，把活化的菌株挑取放入 LB 液体培养基中，30℃摇床上放置 1d。用灭菌牙签挑取菌落在选择培养基平板上轻轻扎 3 个点。将平板倒置，放于 30℃恒温培养箱中培养 2～3d。染色观察，往平板中加入适量卢戈氏碘液溶液，静置 5min，弃去多余染液观察平板上是否出现透明圈。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（*H*）、菌落的直径（*C*），统计 *H*/*C* 值，作为普鲁兰酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）普鲁兰酶活性测定

测定原理：普鲁兰酶（pullulanase）是一类淀粉脱支酶，因其能专一性水解普鲁兰糖（pullulan，麦芽三糖以 α-1,6 糖苷键连接起来的聚合物）而得名，属淀粉酶类，能够专一性切开支链淀粉分支点中的 α-1,6-糖苷键，切下整个分支结构，形成直链淀粉。与异淀粉酶不同的是，普鲁兰酶可以将最小单位的支链分解，最大限度地利用淀粉原料，而异淀粉酶虽然也能水解分支点的 α-1,6-糖苷键，但是不能水解由 2～3 个葡萄糖残基构成的侧支。含有普鲁兰酶的芽胞杆菌可将淀粉分解为单糖（葡萄糖），通过测定单糖的含量，可以计算出普鲁兰酶活性。

试剂配制：①3,5-二硝基水杨酸（DNS）显色液，准确称取 6.3g 3,5-二硝基水杨酸置于 2mol/L 氢氧化钠 262ml 溶液中，然后加酒石酸钾钠的热溶液（182.0g 酒石酸钾钠溶于 500ml 水中），再加入 5.0g 苯酚和 5.0g 亚硫酸钠，搅拌至溶解，冷却后定容至 1000ml，装于棕色瓶中备用。②磷酸缓冲液（pH6.0）：0.2mol/L Na_2HPO_4 12.3ml，0.2mol/L NaH_2PO_4 87.7ml。③1%普鲁兰多糖：称取 1.0g 普鲁兰多糖加入水中，加热溶解，加入 50ml 缓冲液，并用纯水定容至 100ml。④标准葡萄糖溶液（1.00mg/ml）：称取干燥至恒重的葡萄

糖 100mg，溶解后定容至 100ml，置于冰箱中备用。

标准曲线，取 7 支 20ml 刻度试管，按表 2-14 取试剂。在工作波长为 520nm 下，以纯水调零，测定各管的 OD 值。以 OD 值为纵坐标，葡萄糖浓度为横坐标，绘制出葡萄糖标准曲线图 2-7，得葡萄糖标准曲线公式：y=0.6995x+0.028，其中 R^2=0.9952。

表 2-14　葡萄糖标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
葡萄糖质量/mg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
DNS/ml				2.5			
沸水浴/min				10			
定容/ml				20			
OD_{520} 值	0.000	0.171	0.328	0.470	0.603	0.702	0.860

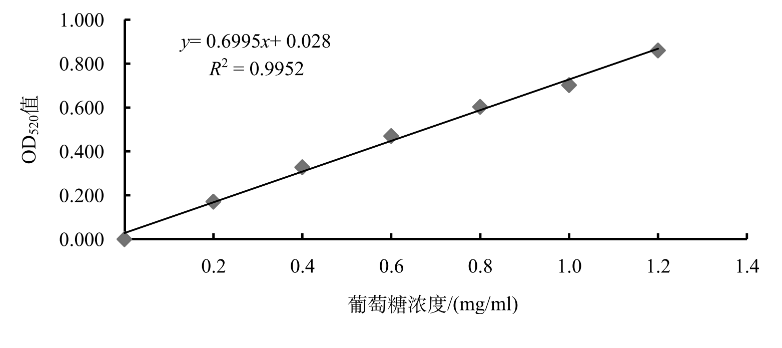


图 2-7　葡萄糖标准曲线

测定方法：以芽胞杆菌为例，用无菌接菌环从活化的平板上挑取单菌落，接种到装有 LB 液体培养基的三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 的恒温摇床中培养 24h，即作为种子液。接种培养及淀粉酶的提取，用移液枪吸取 2ml 种子液（2%的接种量）加入盛有 100ml 灭菌发酵培养基的 250ml 三角瓶中。将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，10min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-15 次序向各试管加入试剂及酶液，并按表格步骤操作。

酶活计算：酶活性按国际单位规定，定义每 1ml 普鲁兰酶在 1min 内催化普鲁兰多糖水解生成 1μg 的葡萄糖为一个酶活性单位 U（U/ml）。

$$U=\frac{N\times B}{30\text{ml}}\times 1000 \tag{2-6}$$

式中，U 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{520} 值所对应的葡萄糖的量（μg），30 为反应时间 30min。

表 2-15　普鲁兰酶活性测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	—	0.5	0.5	0.5
1%普鲁兰多糖溶液/ml		2.5		
40℃水浴/min		30		
沸水浴/min		10（试管 1 中加入 1ml 粗酶液）		
DNS 溶液/ml		2.5		
沸水浴/min		10		
定容/ml		20		
OD_{520}值				

9. 芽胞杆菌果胶酶活性测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产果胶酶筛选培养基上，37℃倒置培养 48h。在菌落周围滴加卢戈氏碘液，卢戈氏碘液能与多糖发生显色反应，若菌株能产果胶酶，则使得菌落周围的果胶被分解为单糖而出现透明圈。测定并记录透明圈与菌落直径的比值，便可以初步判断该菌是否产生果胶酶。

试剂配制：①液体发酵培养基，可溶性淀粉 10.0g、酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml，pH7.0。②3,5-二硝基水杨酸（DNS）显色液，准确称取 6.3g 3,5-二硝基水杨酸置于 2mol/L 氢氧化钠 262ml 溶液中，然后加酒石酸钾钠的热溶液（182.0g 酒石酸钾钠溶于 500ml 水中），再加入 5.0g 苯酚和 5.0g 亚硫酸钠，搅拌至溶解，冷却后定容至 1000ml，装于棕色瓶中备用。③磷酸缓冲液（pH6.0），0.2mol/L Na_2HPO_4 12.3ml，0.2 mol/L NaH_2PO_4 87.7ml。④1%普鲁兰多糖，称取 1.0g 普鲁兰多糖加入水中，加热溶解，加入 50ml 缓冲液，并用纯水定容至 100ml。⑤标准 D-半乳糖醛酸溶液（1.00mg/ml），称取干燥至恒重的 D-半乳糖醛酸 100mg，溶解后定容至 100ml，置于冰箱中备用。

表 2-16　D-半乳糖醛酸标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5	6
D-半乳糖醛酸标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
葡萄糖质量/mg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
DNS/ml				2.5			
沸水浴/min				10			
定容/ml				20			
OD_{520}值	0.000	0.171	0.328	0.470	0.603	0.702	0.860

标准曲线：取 7 支 20ml 刻度试管，按表 2-16 取试剂。在工作波长为 520nm 下，以

纯水调零，测定各管的 OD 值。以 OD 值为纵坐标，D-半乳糖醛酸浓度为横坐标，绘制出 D-半乳糖醛酸标准曲线（图 2-8），得到葡萄糖标准曲线公式：y=0.6995x+0.028，其中 R^2=0.9952。

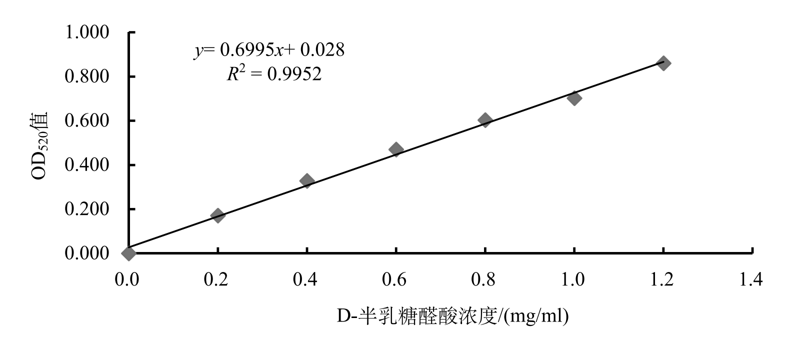


图 2-8　D-半乳糖醛酸标准曲线

测定方法：用无菌接菌环从活化的平板上挑去单菌落，接种到装有 LB 液体培养基的三角瓶中，将三角瓶置于 30℃、170r/min 的恒温摇床中培养 24h 即作为种子液。接种培养及淀粉酶的提取，用移液枪吸取 2ml 种子液（2%的接种量）加入盛有 100ml 灭菌发酵培养基的 250ml 三角瓶中。将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，10min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-17 次序向个试管加入试剂及酶液，并按表格步骤操作。

表 2-17　果胶酶活测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	1	-	-	-
沸水浴/min		5		
粗酶液/ml	-	1	1	1
果胶溶液/ml		3		
50℃ 水浴/min		30		
沸水浴/min		10		
DNS 溶液/ml		3		
沸水浴/min		10		
定容		20		
OD_{520} 值				

酶活计算：酶活性按国际单位规定，定义每 1ml 果胶酶在 1min 内水解果胶质生成 1μmol 的半乳糖醛酸所需的酶量为一个酶活性单位 U（U/ml）。

$$U=\frac{N\times B}{t\times 1\text{ml}}\times 1000 \qquad (2\text{-}7)$$

式中，U 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{520} 值所对应的半乳糖醛酸的量（μg），t 为反应时间（min）。

10. 芽胞杆菌几丁质酶活性测定

（1）几丁质酶水解透明圈测定

测定原理：将活化后的菌株用灭过菌的牙签点种于产几丁质酶筛选培养基上，37℃倒置培养48h。在培养基上加入无水乙醇，静置2～3h，无水乙醇能使多糖发生显色反应，若菌株能产几丁质酶，则使得菌落周围的几丁质被分解为单糖而出现透明圈。测定并记录透明圈与菌落直径的比值，便可以初步判断该菌是否产生几丁质酶。

试剂配制：①液体选择培养基：几丁质5g、酵母提取物10.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨10.0g、水100ml、pH 7.0。②固体显色培养基：几丁质3g、水1000ml，pH 7.0。

测定方法：从菌种库中取出需要活化的菌株在LB平板上划线培养30℃、2d。种子液制备，在平板上挑取菌落，接种在LB液体培养基中30℃、1d。发酵液制备，用移液枪取400μl种子液加入到20ml发酵液培养基中，放在30℃、170r/min恒温摇床里发酵培养2d。粗酶液制备，取发酵培养液2ml，10 000r/min、4℃离心10min，上清液为粗酶液，放于4℃冰箱备用。打孔培养基，取20ml几丁质培养基倒入培养皿中，冷却后用7mm直径的打孔器在固体培养基中打3个孔。每种粗酶液做3个平行，每个孔加入90μl粗酶液；放入37℃ 培养箱培养5h。染色，往培养皿中加入适量刚果红染色15min，弃废液，用1mol/L的NaCl洗脱，产几丁质酶菌落周围出现明显的透明圈。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（H）、菌落的直径（C），统计H/C值，作为几丁质酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）几丁质酶活性测定

测定原理：酶液的混合液事先在沸水浴中煮沸10min以灭活CHT，再加入胶状几丁质溶液继续上述反应操作。酶的活性表示为样品每毫克蛋白质中1min内由CHT催化反应生成的*N*-乙酰氨基葡萄糖量。

试剂配制：①磷酸缓冲液（pH6.6）：量取0.2mol/L 的磷酸氢二钠12.5ml 和0.2mol/L的磷酸二氢钠 87.5ml 混合，即为pH6.6的磷酸缓冲液。②3,5-二硝基水杨酸（DNS）试剂：将6.3g DNS和262ml NaOH（2ml/L）溶液，加入到500ml含有185g酒石酸钾钠的热水溶液中，再加5g结晶酚和5g亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加蒸馏水定容至1000ml，贮于棕色瓶备用（7d后方可用）。③胶体几丁质：称取10.0g几丁质细粉加入100ml 浓盐酸中，边加边搅拌，于4℃放置24h，将被盐酸溶解的糊状几丁质转移到研钵中，再加入100ml 浓盐酸，研磨均匀后用4层纱布过滤，滤液中加入500ml 50%乙醇，不断搅拌至胶体充分析出，3000r/min 离心10min ，用超纯水洗涤沉淀至中性，4℃保存备用。④发酵培养基，胶体几丁质5g、酵母粉5.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨10.0g、磷酸二氢钾0.5g、磷酸氢二钾0.5g、纯水1000ml，pH7.0。⑤*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖（NAG）标准溶液：准确称取1.0g烘干至恒重的NAG粉末，溶解于超纯水中，定容至100ml，置于4℃保藏。

标准曲线：*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖（NAG）标准曲线测定，取7支25ml试管，按表2-18取试剂。在工作波长为540nm下，以纯水调零，测定各管的OD值。以OD值为纵坐标，*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖质量为横坐标，绘制出NAG标准曲线（图2-9），得NAG标准曲线公式：y=0.4165x+0.0319，其中R^2=0.9943。

表 2-18　NAG 标准曲线绘制

试管号	0	1	2	3	4	5	6
NAG 标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
纯水/ml	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
NAG 质量/mg	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
DNS/ml	3	3	3	3	3	3	3
沸水浴/min				10			
定容/ml				20			
OD_{540} 值							

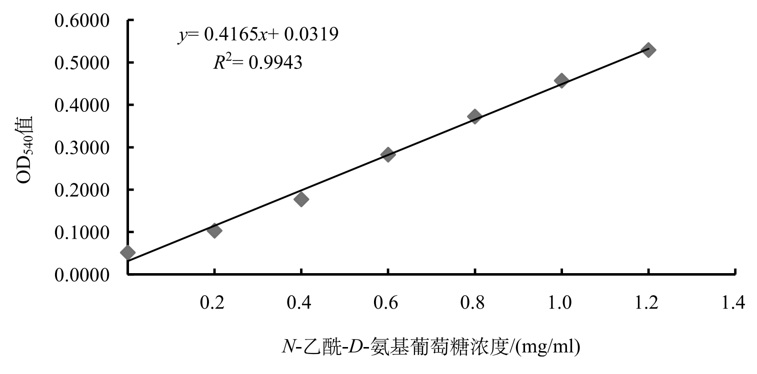


图 2-9　*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖标准曲线

测定方法：将初筛具有产几丁质酶的芽胞杆菌活化，挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中 30℃、170r/min 条件下培养 24h 作为种子液。以 2%的接种量接入装有 50ml 发酵培养基的 250ml 锥形瓶中，置于 30℃、170r/min 恒温摇床中培养 48h 后终止发酵。发酵液 6000r/min 离心 10min，按表 2-19 操作测定几丁质酶活。

表 2-19　几丁质酶活性测定

编号	1	2	3	4
粗酶液/ml	1	—	—	—
沸水浴/min		5		
粗酶液/ml	—	1	1	1
蒸馏水/ml	3	—	—	—
1%胶体几丁质/ml		3		
沸水浴/min		10		
离心		6000 r/min、5min		
取上清液/ml		2		
DNS 溶液/ml		3		
沸水浴/min		10		
定容/ml		20		
OD_{540} 值				

酶活计算：酶活性按国际单位规定，在 pH6.6、温度为 50℃的情况下，每 1min 内催化几丁质水解生成 1μg 的 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖所用的酶量为一个酶活性单位 U(U/ml)。

$$U = \frac{N \times B}{t \times 1} \times 1000 \tag{2-8}$$

式中，U 为 1ml 粗酶液的酶活（U/ml）；N 为测试粗酶液稀释倍数；B 为测定 OD_{540} 值所对应的 NAG 的质量（mg），t 为反应时间（min）。

11. 芽胞杆菌植酸酶活性测定

（1）植酸酶水解透明圈测定

测定原理：将营养平板上的单菌落点种到含有植酸钙（钠）的植酸酶筛选培养基上，28℃培养 3～5d，观察是否产生透明消解圈。由于有些细菌可能产生过量的酸性代谢产物，也可使筛选培养基出现透明的消解圈，引起假阳性的出现，因此必须将产生透明消解圈的菌株经产酶培养基培养后，取培养液在中性条件下进行植酸酶活性的测定，并进一步进行镜检和生化鉴定。

试剂配制：选择培养基，植酸钙 5.0g、葡萄糖 10.0g、$(NH_4)_2SO_4$ 0.3g、$MgSO_4$ 0.5g、$CaCl_2$ 0.1g、$MnSO_4$ 0.01g、$FeSO_4$ 0.01g 琼脂 15～20g、水 1000ml，pH7.0。

测定方法：以芽胞杆菌为例，取单菌落划线于平板上，将平板置于 30℃恒温培养箱中培养 1～2d。液体培养，灭菌接种环挑取 1～2 个单菌落接种至盛有 20ml LB 液体培养基的锥形瓶中，在 30℃、170r/min 摇床中培养 1d。筛选：用灭菌的牙签蘸取菌液，在选择培养基平板上轻轻点样，设 3 个平行。将平板倒置，放于 30℃恒温培养箱中培养 2～3d。染色观察，往平板中加入适量卢戈氏碘液溶液，静置 5min，弃去多余染液，观察平板上是否出现透明圈。

测量统计：用游标卡尺测定透明圈直径（H）、菌落的直径（C），统计 H/C 值，作为植酸酶活性指标，对平板进行拍照记录。

（2）植酸酶活性测定

测定原理：植酸酶在一定温度和 pH 条件下，水解底物植酸钠，生成正磷酸和肌醇衍生物，在酸性溶液中，用钒钼酸铵处理会生成黄色的[$(NH_4)_3PO_4NH_4VO_3 \cdot 16MoO_3$]复合物，在波长 415nm 下进行比色测定。

试剂配制：①植酸钠液体发酵培养基：植酸钠 10g、葡萄糖 10.0g、$CaCl_2$ 0.1g、$(NH_4)_2SO_4$ 5.0g、$FeSO_4$ 0.01g、$MgSO_4$ 0.01g、水 1000ml，pH7.0。②乙酸缓冲液：$CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 为 0.25mol/L：称取 34.02g 三水乙酸钠、0.1g 吐温 20，于 1000ml 容量瓶中，加入 900ml 水溶解，用盐酸调节 pH 至 5.5，并用蒸馏水定容至 1000ml，室温下存放 2 个月有效。③植酸钠溶液：$C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$ 为 7.5mmol/L，称取 0.6929g 肌醇六磷酸钠（$C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$）于 100ml 容量瓶中，用乙酸缓冲液溶解并定容至刻度，现用现配（实际反应液中的最终浓度为 5.0mmol/L）。④硝酸溶液：1+2 水溶液。⑤100g/L 钼酸铵溶液：称取 10g 钼酸铵[$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$]于 100ml 容量瓶中，加入 1.0ml 氨水（25%），用水溶解定容至刻度。⑥2.35g/L 钒酸铵溶液：称取 0.235g 钒酸铵（NH_4VO_3）于 100ml 棕色容量瓶中，加入 2ml 硝酸溶液，用水溶解定容至刻度。避光条件下保存一

周有效（注：钼酸铵先用沸水溶解后再加硝酸）。⑦颜色终止液：移取 2 份硝酸溶液，1 份钼酸铵溶液，1 份钒酸铵溶液混合后使用，现用现配。

标准曲线：磷酸标准曲线测定，取 7 支 20ml 刻度试管，按表 2-20 取试剂。在工作波长为 415nm 下，以阴性对照调零，测定各管的吸光度。以吸光度为纵坐标，磷浓度为横坐标，绘制出磷酸标准曲线，y=0.2863x+0.0947，R^2=0.999（图 2-10）。

表 2-20　磷酸标准曲线

试管号	0	1	2	3	4	5
磷酸标准液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
磷物质的量/mmol	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
终止液/ml	4	4	4	4	4	4
OD_{415}值	0.0987	0.1479	0.2074	0.2663	0.3203	0.3846

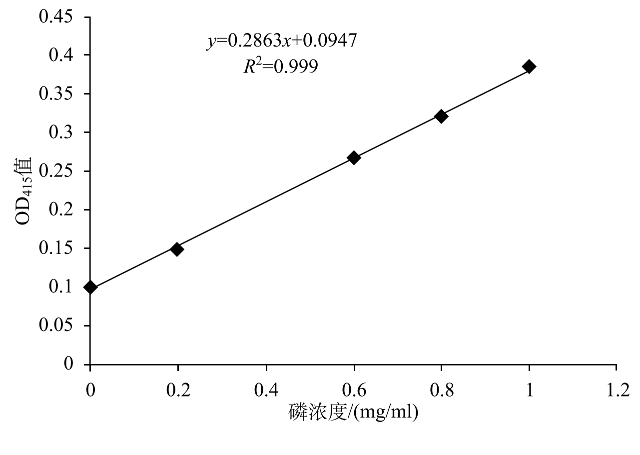


图 2-10　磷酸标准曲线

测定方法：以芽胞杆菌为例，用移液枪吸取 1ml 种子液（2%的接种量）加入盛有 50ml 灭菌发酵培养基的 250ml 三角瓶中。将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。培养 48h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（6000r/min，10min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。取 4 支具塞刻度试管，按表 2-21 次序向各试管加入试剂及酶液，并按表格步骤操作。

表 2-21　植酸酶活性测定

反应顺序	样品	标准空白
加乙酸缓冲液	1.8ml	1.8ml
加入待反应液	0.2ml	0.2ml
混合	√	√
37℃预热 5min	√	—

续表

反应顺序	样品	标准空白
依次加入底物	4ml	4ml（终止液）
混合	√	√
37℃水解 30min	√	—
依次加入终止液	4ml	4ml（底物）
混合	√	√
总体积	10ml	10ml

酶活计算：样品在植酸钠浓度为 5.0mmol/L、温度 37℃、pH5.5 的条件下，每分钟从植酸钠中释放 1mmol 无机磷，即为一个植酸酶酶活性单位，以 U 表示。

$$U=\frac{C}{m\times 30}\times F \qquad (2\text{-}9)$$

式中， U 为试样中植酸酶的活性（U/g）；C 为根据实际样液的吸光值由直线回归方程计算出的酶活性（U）；F 为试样溶液反应前的总稀释倍数；m 为试样质量（g）；30 为反应时间 30min。

第三节　芽胞杆菌产酶特性的普查

一、概述

对于芽胞杆菌产酶研究多采取液态发酵法，在发酵过程中，芽胞杆菌培养条件简单、周期短、能分泌大量胞外酶、易提取、易纯化、易扩大生产规模、利于酶制剂的工业化生产。通过前期的水解透明圈的初筛，初步了解各菌株酶活性的大小。复筛则主要是通过液态发酵获得各种粗酶液，采用相应的测定方法来明确各个菌株产酶活性，准确地判断每个产酶菌株在一定条件下的产酶量。通过酶活性测定，可以准确地比较在同一条件下不同菌株的产酶情况。酶活性测定得到的菌株产酶情况与透明圈初筛结果有些不同，引起误差的原因有多个方面，首先初筛结果是根据 H（水解透明圈）/C（菌落直径）的值确定的，没有考虑透明圈清晰度的问题，透明圈初筛结果只是从一个方面确定的；其次是测量误差引起的，透明圈初筛中培养基无法控制完全均匀、游标卡尺的读数误差等。

芽胞杆菌中同一种酶可以采用不同方式进行酶活性测定，比较同一种酶时，在同一条件下，用同样的检测方法得出酶活的大小，可以筛选出产酶不同高低的菌株。对于木聚糖酶、蛋白酶、果胶酶、普鲁兰酶、几丁质酶采用灵敏度强的 DNS 法测定，植酸酶采取中华人民共和国国家标准法进行测定，从而保证试验数据的准确合理性。国内外学者对于微生物产酶进行大量研究，但是大多只是研究某个单一菌株的产酶情况。本节对国内采集的芽胞杆菌 14 个种 41 个菌株的产酶情况进行普查，利用水解透明圈的初筛方法，对 10 个常见的酶进行测定，为芽胞杆菌酶学的研究提供科学数据。同时，选择 6 个芽胞杆菌属、116 个芽胞杆菌标准菌株，6 种酶，即木聚糖酶、普鲁兰酶、蛋白酶、果胶酶、

几丁质酶、植酸酶进行活性测定，分析芽胞杆菌种间产酶特性的相关性，为芽胞杆菌酶学的研究奠定了资源分析基础。

二、芽胞杆菌产酶特性水解透明圈测定

为普查芽胞杆菌产酶特性，利用酶的水解透明圈测定，选择芽胞杆菌 14 个种的 41 个菌株，包括地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）、多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）、蜂房类芽胞杆菌（*B. alvei*）、浸麻类芽胞杆菌（*P. macerans*）、巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、苛求芽胞杆菌（*B. fastidiosus*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）、球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）、苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）、圆孢芽胞杆菌（*B. globisporus*）、中孢短芽胞杆菌（*B. centrosporus*）等，进行淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、漆酶、脂肪酶、溶菌酶、普鲁兰酶、几丁质酶的普查，分析芽胞杆菌产酶特性和各种酶类的相关性。测定结果见表 2-22。对不同种类芽胞杆菌的产酶特性进行测定，并记录透明圈与菌落直径的比值，±为 *H*/*C* 值小于 2，+为 *H*/*C* 值为 2～3，++为 *H*/*C* 值大于 3。同一种芽胞杆菌的不同菌株，产酶特性差异很大，如地衣芽胞杆菌 201、菌株 276、菌株 277，产淀粉酶特性为±、–、+等等。不同种类芽胞杆菌，产酶特性可以相同，如枯草芽胞杆菌 4（BM1-4）和苏云金芽胞杆菌 26（Xs115）产淀粉酶特性为++等。

表 2-22　芽胞杆菌产酶特性

菌种	菌株编号	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	木聚糖酶	果胶酶	漆酶	脂肪酶	溶菌酶	普鲁兰酶	几丁质酶
1 地衣芽胞杆菌	201	±	+	++	++	++	–	–	++	+	++
2 地衣芽胞杆菌	276	–	+	+	+	+	–	–	–	++	++
3 地衣芽胞杆菌	277	+	±	++	++	+	–	–	±	+	++
4 短小芽胞杆菌	705	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–
5 多粘类芽胞杆菌	740	±	+	++	++	++	–	–	–	++	++
6 多粘类芽胞杆菌	526	+	+	++	++	+	–	–	–	+	++
7 多粘类芽胞杆菌	527	–	+	++	+	±	–	–	++	+	–
8 多粘类芽胞杆菌	528	±	+	++	+	++	–	–	–	++	++
9 多粘类芽胞杆菌	6-man	–	±	++	++	+	–	–	–	+	–
10 蜂房类芽胞杆菌	270	±	+	+	+	–	–	–	+	++	++
11 浸麻类芽胞杆菌	202	±	+	++	++	++	–	–	++	++	++
12 巨大芽胞杆菌	543	±	±	++	±	±	–	–	–	±	++
13 巨大芽胞杆菌	544	±	+	++	++	++	–	–	–	+	++
14 巨大芽胞杆菌	706	+	+	+	++	+	–	–	–	+	++
15 苛求芽胞杆菌	273	+	±	++	++	++	–	–	–	++	++
16 枯草芽胞杆菌	4	++	+	++	++	++	–	–	++	±	++
17 枯草芽胞杆菌	523	–	±	–	–	–	–	–	–	–	±

续表

菌种	菌株编号	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	木聚糖酶	果胶酶	漆酶	脂肪酶	溶菌酶	普鲁兰酶	几丁质酶
18 枯草芽胞杆菌	524	++	±	±	++	++	−	−	−	+	++
19 枯草芽胞杆菌	525	+	+	++	++	++	−	−	+	++	++
20 枯草芽胞杆菌	5447	++	+	++	++	++	−	−	−	++	++
21 蜡状芽胞杆菌	559	−	±	++	+	+	−	−	−	++	−
22 蜡状芽胞杆菌	560	±	+	++	+	++	−	−	−	++	++
23 蜡状芽胞杆菌	615	±	±	+	−	+	−	−	−	++	++
24 蜡状芽胞杆菌	7	±	±	++	+	++	−	−	−	+	−
25 蜡状芽胞杆菌	704	±	+	++	++	−	−	−	−	++	++
26 凝结芽胞杆菌	519	−	++	−	±	−	−	−	−	−	−
27 球形赖氨酸芽胞杆菌	532	+	±	±	+	+	−	−	−	±	++
28 球形赖氨酸芽胞杆菌	533	±	±	±	++	++	−	−	−	+	++
29 球形赖氨酸芽胞杆菌	534	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
30 球形赖氨酸芽胞杆菌	535	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
31 球形赖氨酸芽胞杆菌	752	++	±	+	+	++	−	−	−	++	++
32 苏云金芽胞杆菌	12	−	±	±	+	+	−	−	−	±	++
33 苏云金芽胞杆菌	25	+	+	++	++	++	−	−	−	++	++
34 苏云金芽胞杆菌	26	++	±	++	−	±	−	−	−	+	++
35 苏云金芽胞杆菌	31	++	±	±	±	++	−	−	−	−	−
36 苏云金芽胞杆菌	340	++	±	+	++	+	−	−	−	++	++
37 苏云金芽胞杆菌	38	−	−	±	−	−	−	−	−	−	++
38 苏云金芽胞杆菌	521	++	±	+	+	+	−	−	−	++	++
39 苏云金芽胞杆菌	702	±	+	++	+	+	−	−	−	++	++
40 圆孢芽胞杆菌	518	−	−	++	+	±	−	−	−	+	−
41 中孢短芽胞杆菌	522	++	±	+	+	++	−	−	−	++	++

注：±为 H/C 值小于 2；+为 H/C 值介于 2～3；++为 H/C 值大于 3；−为无此特性

三、基于产酶特性的芽胞杆菌种类聚类分析

将表 2-22 的结果进行数量化，设−为 0，±为 1，+为 2，++为 3，建立数量化矩阵见表 2-23。以种名为样本，以产酶特性为指标，以欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类。分析结果见图 2-11。从总体来看，大部分供试的芽胞杆菌种类能产纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、普鲁兰酶、几丁质酶，供试芽胞杆菌产蛋白酶和淀粉酶的能力中等，供试芽胞杆菌几乎不产漆酶和脂肪酶（图 2-11）。产酶芽胞杆菌特性分析，以酶类为指标，以芽胞杆菌为样本，以欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类。分析结果见图 2-12。聚类结果表明，可将供试芽胞杆菌产酶能力分为 3 类：第 1 类为产酶能力较差的菌株，包括短小芽胞杆菌 4、凝结芽胞杆菌 26、球形赖氨酸芽胞杆菌 29、球形赖氨酸芽

胞杆菌 30、枯草芽胞杆菌 17、苏云金芽胞杆菌 37、苏云金芽胞杆菌 35；第 2 类为产酶能力中等的菌株，包括多粘类芽胞杆菌 9、蜡状芽胞杆菌 21、圆孢芽胞杆菌 40、蜡状芽胞杆菌 24、多粘类芽胞杆菌 7；第 3 类为产酶能力较强的菌株，包括其余的菌株。

表 2-23　芽胞杆菌产酶特性的数量化矩阵

菌种	菌株编号	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	木聚糖酶	果胶酶	漆酶	脂肪酶	溶菌酶	普鲁兰酶	几丁质酶
1 地衣芽胞杆菌	201	1	2	3	3	3	0	0	3	2	3
2 地衣芽胞杆菌	276	0	2	2	2	2	0	0	0	3	3
3 地衣芽胞杆菌	277	2	1	3	3	2	0	0	1	2	3
4 短小芽胞杆菌	705	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
5 多粘类芽胞杆菌	740	1	2	3	3	3	0	0	0	3	3
6 多粘类芽胞杆菌	526	2	2	3	3	2	0	0	0	2	3
7 多粘类芽胞杆菌	527	0	2	3	2	1	0	0	3	2	0
8 多粘类芽胞杆菌	528	1	2	3	2	3	0	0	0	3	3
9 多粘类芽胞杆菌	6-man	0	1	3	3	2	0	0	0	2	0
10 蜂房类芽胞杆菌	270	1	2	2	2	0	0	0	2	3	3
11 浸麻类芽胞杆菌	202	1	2	3	3	3	0	0	3	3	3
12 巨大芽胞杆菌	543	1	1	3	1	1	0	0	0	1	3
13 巨大芽胞杆菌	544	1	2	3	3	3	0	0	0	2	3
14 巨大芽胞杆菌	706	2	2	2	3	2	0	0	0	2	3
15 苛求芽胞杆菌	273	2	1	3	3	3	0	0	0	3	3
16 枯草芽胞杆菌	4	3	2	3	3	3	0	0	3	1	3
17 枯草芽胞杆菌	523	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
18 枯草芽胞杆菌	524	3	1	1	3	3	0	0	0	2	3
19 枯草芽胞杆菌	525	2	2	3	3	3	0	0	2	3	3
20 枯草芽胞杆菌	5447	3	2	3	3	3	0	0	0	3	3
21 蜡状芽胞杆菌	559	0	1	3	2	2	0	0	0	3	0
22 蜡状芽胞杆菌	560	1	2	3	2	3	0	0	0	3	3
23 蜡状芽胞杆菌	615	1	1	2	0	2	0	0	0	3	3
24 蜡状芽胞杆菌	7	1	1	3	2	3	0	0	0	2	0
25 蜡状芽胞杆菌	704	1	2	3	3	0	0	0	0	3	3
26 凝结芽胞杆菌	519	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0
27 球形赖氨酸芽胞杆菌	532	2	1	1	2	2	0	0	0	1	3
28 球形赖氨酸芽胞杆菌	533	1	1	1	3	3	0	0	0	2	3
29 球形赖氨酸芽胞杆菌	534	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 球形赖氨酸芽胞杆菌	535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31 球形赖氨酸芽胞杆菌	752	3	1	2	2	3	0	0	0	3	3
32 苏云金芽胞杆菌	12	0	1	1	2	2	0	0	0	1	3

续表

菌种	菌株编号	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	木聚糖酶	果胶酶	漆酶	脂肪酶	溶菌酶	普鲁兰酶	几丁质酶
33 苏云金芽胞杆菌	25	2	2	3	3	3	0	0	0	3	3
34 苏云金芽胞杆菌	26	3	1	3	0	1	0	0	0	2	3
35 苏云金芽胞杆菌	31	3	1	1	1	3	0	0	0	0	0
36 苏云金芽胞杆菌	340	3	1	2	3	2	0	0	0	3	3
37 苏云金芽胞杆菌	38	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3
38 苏云金芽胞杆菌	521	3	1	2	2	2	0	0	0	3	3
39 苏云金芽胞杆菌	702	1	2	3	2	2	0	0	0	3	3
40 圆孢芽胞杆菌	518	0	0	3	2	1	0	0	0	2	0
41 中孢短芽胞杆菌	522	3	1	2	2	3	0	0	0	3	3
合计		54	58	88	82	79	0	0	17	82	91

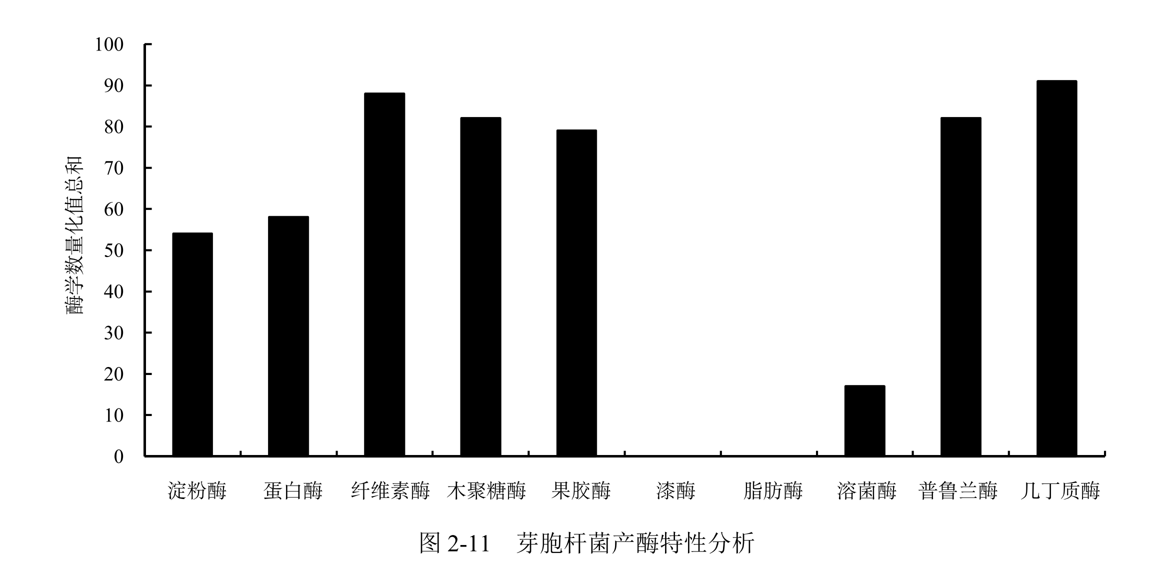


图 2-11　芽胞杆菌产酶特性分析

研究还发现，同种类芽胞杆菌的不同菌株，可以有不同的产酶能力，如苏云金芽胞杆菌的不同菌株，分布在不同的菌株产酶类别中，说明该种类的不同菌株有着不同的产酶能力。而不同种类的芽胞杆菌可以有相同的产酶能力，如球形赖氨酸芽胞杆菌 31 和中孢短芽胞杆菌 41，都属于第 3 类，产酶能力和酶种类比较相近。

四、基于芽胞杆菌的产酶特性聚类分析

基于芽胞杆菌种类的产酶特性分析，以种名为指标，以产酶特性为样本，以欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类。分析结果见图 2-13。聚类结果表明，产酶特性可以分为两类，第 1 类为芽胞杆菌经常能够产生的酶类，如纤维素酶、普鲁兰酶、木聚糖酶、果胶酶、几丁质酶、淀粉酶、蛋白酶；第 2 类为芽胞杆菌经常不能产生的酶类，如

漆酶、脂肪酶、溶菌酶（图 2-13）。

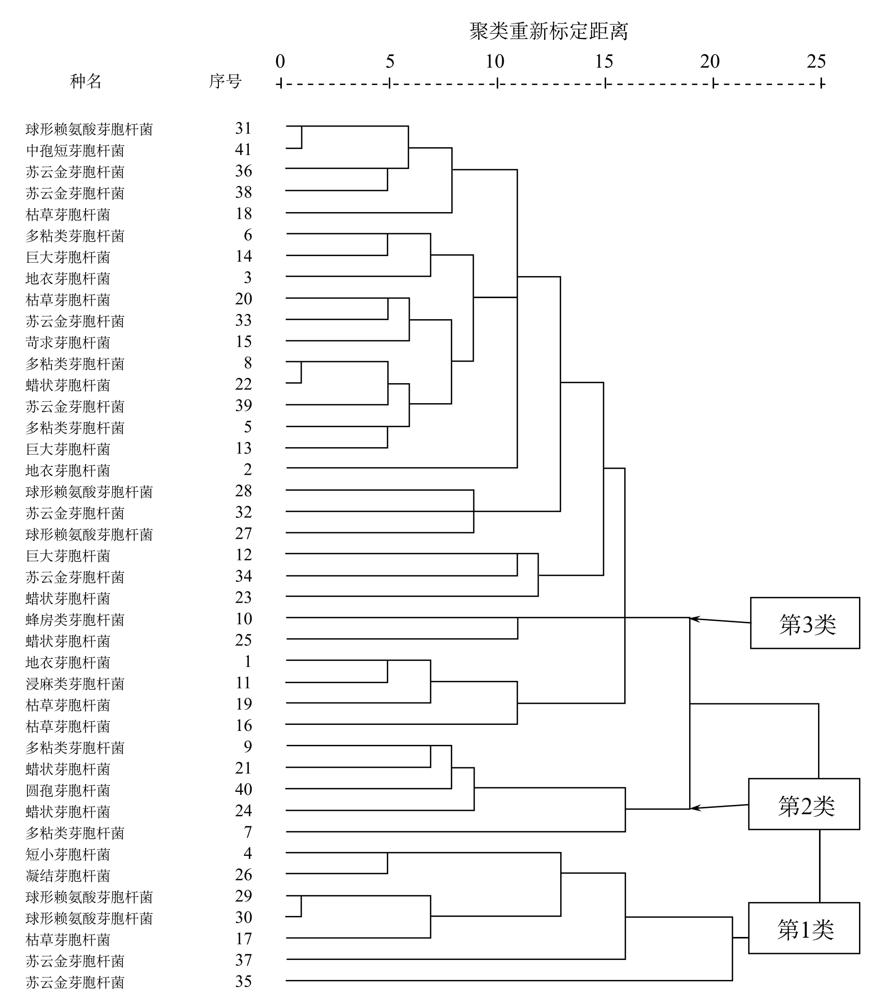


图 2-12　基于产酶特性的芽胞杆菌聚类分析

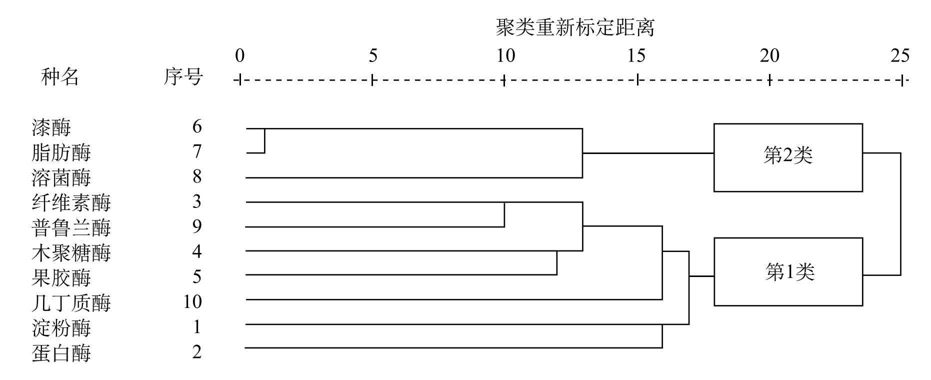


图 2-13　基于产酶特性的芽胞杆菌聚类分析

五、芽胞杆菌几种重要酶活性测定

1. 芽胞杆菌酶活性测定

选择 118 个芽胞杆菌，包含了 6 个芽胞杆菌属 114 个种，对其 6 种酶，即木聚糖酶、普鲁兰酶、蛋白酶、果胶酶、几丁质酶、植酸酶等进行活性测定。测定结果见表 2-24。

表 2-24　118 株芽胞杆菌的重要酶活性

	菌株名称	A	B	C	D	E	F
1	*A. aneurinilyticus* FJAT-10004（解硫胺素芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	*A. migulanus* FJAT-14205（米氏解硫胺素芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	*B. acidiproducens* FJAT-14209（产酸芽胞杆菌）	0.00	0.00	2.20	25.50	0.00	0.01
4	*B. agaradhaerens* FJAT-10013（黏琼脂芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	*B. amyloliquefaciens* FJAT-2349（解淀粉芽胞杆菌）	0.00	42.27	30.79	31.06	0.00	0.00
6	*B. arsenicus* FJAT-10027（砷芽芽胞杆菌）	0.00	2.76	0.13	0.00	0.00	0.00
7	*B. aryabhattai* FJAT-14220（阿氏芽胞杆菌）	0.00	0.00	5.46	0.00	0.00	0.00
8	*B. barbaricus* FJAT-10042（罕见芽胞杆菌）	0.00	1.76	19.36	6.32	0.00	0.00
9	*B. bataviensis* FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌）	0.00	0.00	7.89	10.43	0.00	0.00
10	*B. beijingensis* FJAT-14214（北京芽胞杆菌）	0.00	0.00	2.76	0.00	0.00	0.00
11	*B. butanolivorans* FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	11.36	0.00
12	*B. centrosporus* FJAT-8759（中孢短芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13	*B. cereus* FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌）	0.00	5.48	0.00	0.00	0.00	0.00
14	*B. circulans* FJAT-8761（环状芽胞杆菌）	0.00	9.96	0.00	0.00	0.00	0.00
15	*B. clausii* FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌）	0.00	3.29	0.00	0.00	0.00	0.00
16	*B. coagulans* FJAT-8763（凝结芽胞杆菌）	0.00	6.91	0.00	0.00	0.00	0.13
17	*B. cohnii* FJAT-10017（科氏芽胞杆菌）	0.00	0.00	13.47	12.26	0.00	0.00
18	*B. decisifrondis* FJAT-14222（腐叶芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	*B. flexus* FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌）	0.00	1.14	0.00	0.00	0.00	0.00
20	*B. fordii* FJAT-10032（福氏芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	8.38	13.54	0.10
21	*B. fortis* FJAT-10033（强壮芽胞杆菌）	0.00	5.38	0.00	0.00	13.38	0.00
22	*B. galliciensis* FJAT-14239（加利西亚芽胞杆菌）	0.00	0.00	27.18	0.00	0.00	0.00
23	*B. gelatini* FJAT-10035（明胶芽胞杆菌）	0.00	0.00	4.20	0.00	0.00	0.00
24	*B. ginsengihumi* FJAT-14270（人参土芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	*B. globisporus* FJAT-10036（圆孢芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00
26	*B. halmapalus* FJAT-10022（盐敏芽胞杆菌）	0.00	1.86	0.00	0.00	0.00	0.00
27	*B. hemicellulosilyticus* FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌）	0.00	0.95	8.43	6.78	12.00	0.00
28	*B. horti* FJAT-10049（花园芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	14.85	0.00
29	*B. humi* FJAT-14211（土地芽胞杆菌）	0.00	0.00	1.94	0.00	0.00	0.00
30	*B. hwajinpoensis* FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌）	0.00	3.94	27.00	22.76	0.00	0.00
31	*B. indicus* FJAT-14212（印度芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.90	0.00	0.00	0.00

续表

菌株名称	A	B	C	D	E	F
32 *B. insolitus* FJAT-8767（异常芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
33 *B. isronensis* FJAT-14252（印空研芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
34 *B. kribbensis* FJAT-14240（韩研所芽胞杆菌）	0.00	8.91	2.87	0.00	0.00	0.00
35 *B. laevolacticus* FJAT-8769（右旋乳酸芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	21.70	0.00	0.00
36 *B. lentus* FJAT-8770（迟缓芽胞杆菌）	0.00	0.00	24.62	0.00	0.00	0.00
37 *B. licheniformis* FJAT-8771（地衣芽胞杆菌）	0.00	0.38	24.62	20.63	0.00	0.04
38 *B. litoralis* FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌）	0.00	2.31	26.13	22.91	0.00	0.00
39 *B. luciferensis* FJAT-14206（坎德玛斯岛芽胞杆菌）	0.00	25.24	23.47	0.00	0.00	0.00
40 *B. macauensis* FJAT-14207（澳门芽胞杆菌）	0.00	15.88	2.72	0.00	0.00	0.00
41 *B. macyae* FJAT-14248（马氏芽胞杆菌）	0.00	35.31	8.02	0.00	0.00	0.00
42 *B. marinus* FJAT-8772（海洋芽胞杆菌）	0.00	5.58	0.00	0.00	0.00	0.00
43 *B. methanolicus* FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌）	0.00	8.10	23.83	16.75	0.00	0.00
44 *B. murimartini* FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌）	0.00	6.93	7.43	17.28	0.00	0.00
45 *B. mycoides* FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌）	0.00	1.95	0.00	0.00	0.00	0.00
46 *B. nealsonii* FJAT-14216（尼氏芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
47 *B. niacini* FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.01
48 *B. novalis* FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌）	0.00	0.00	21.72	0.00	0.00	0.00
49 *L. odysseyi* FJAT-14201（奥德赛赖氨酸芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
50 *B. oleronius* FJAT-14224（蔬菜芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
51 *V. pantothenticus* FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌）	0.00	0.91	7.99	10.89	0.00	0.00
52 *B. pseudalcaliphilus* FJAT-14237（假坚强芽胞杆菌）	0.00	0.00	8.70	0.00	0.00	0.00
53 *B. pseudomycoides* FJAT-14225（假蕈状芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
54 *B. psychrosaccharolyticus* FJAT-8777（冷解芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	10.28	0.00	0.00
55 *B. psychrosaccharolyticus* FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14
56 *B. schlegelii* FJAT-8780（施氏芽胞杆菌）	0.00	1.57	0.00	0.00	0.00	0.00
57 *B. selenatarsenatis* FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌）	0.00	17.14	13.42	18.20	0.00	0.00
58 *B. seohaeanensis* FJAT-14231（西岸芽胞杆菌）	0.00	0.14	29.77	21.77	0.00	0.00
59 *B. shackletonii* FJAT-14257（沙氏芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
60 *B. simplex* FJAT-8781（简单芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
61 *B. sonoernsis* FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌）	0.00	2.86	0.00	0.00	0.00	0.01
62 *B. subtilis* subsp. *subtilis* FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种）	0.00	17.86	12.80	23.07	0.00	0.01
63 *B. taeanensis* FJAT-14253（大安芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	22.61	0.00	0.00
64 *G. thermoglucosidasius* FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌）	0.00	8.15	0.00	46.32	0.00	0.00
65 *P. thiaminolyticus* FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌）	0.00	4.57	31.09	0.00	0.00	0.00
66 *B.azotoformans* FJAT-8756（产氮芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	12.25	0.00	0.00
67 *B.halodurans* FJAT-10024（耐盐芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
68 *B.massiliensis* FJAT-8773（马塞芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

续表

菌株名称	A	B	C	D	E	F
69 *B. agri* FJAT-10018（土壤短芽胞杆菌）	0.00	0.00	3.32	0.00	0.00	0.00
70 *B. agri* FJAT-8790（土壤短芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
71 *B. brevis* FJAT-8753（短短芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	19.29	0.00	0.00
72 *B. formosus* FJAT-10011（美丽短芽胞杆菌）	0.00	0.00	8.75	0.00	0.00	0.00
73 *B. scohnii* FJAT-10008（科氏芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
74 *G. kaustophilus* FJAT-8768（好热芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
75 *P. alginolyticus* FJAT-10001（解藻酸类芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
76 *P. alvei* FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌）	0.00	6.34	2.85	20.71	0.00	0.00
77 *P. amylolyticus* FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌）	0.00	0.76	10.42	0.00	0.00	0.00
78 *P. chondroitinus* FJAT-10007（软骨素类芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.07	4.95	0.00	0.00
79 *P. glucanolyticus* FJAT-10020（解葡聚糖类芽胞杆菌）	0.00	0.05	8.60	0.00	0.00	0.00
80 *P. lautus* FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌）	0.00	0.00	12.74	9.75	0.00	0.04
81 *P. validus* FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌）	0.00	0.81	1.27	0.00	11.59	0.00
82 *B. badius* FJAT-8757（栗褐芽胞杆菌）	1.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
83 *B. cecembensis* FJAT-14215（科研中心芽胞杆菌）	1.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
84 *B. megatherium* FJAT-8774（巨大芽胞杆菌）	1.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
85 *L. fusiformis* FJAT-8766（纺锤形赖氨酸芽胞杆菌）	1.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
86 *B. xerothermodurans* FJAT-8789（抗干热芽胞杆菌）	1.97	0.00	16.90	0.00	0.00	0.00
87 *B. smithii* FJAT-8782（史氏芽胞杆菌）	4.79	0.00	0.00	25.83	0.00	0.11
88 *B. lehensis* FJAT-14213（列城芽胞杆菌）	11.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
89 *B. marisflav*i FJAT-14235（黄海芽胞杆菌）	15.99	0.00	4.14	0.00	0.00	0.01
90 *B. horikoshii* FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌）	17.62	0.00	10.77	0.00	0.00	0.00
91 *B. benzoevorans* FJAT-8758（食苯芽胞杆菌）	17.63	5.91	0.00	30.46	0.00	0.00
92 *B. soli* FJAT-14232（土壤芽胞杆菌）	21.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
93 *B. thuringiensis* FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌）	34.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
94 *B. velezensis* FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌）	44.27	0.00	0.00	27.79	0.00	0.00
95 *B. atrophaeus* FJAT-8755（深褐芽胞杆菌）	61.15	10.96	0.00	0.00	0.00	0.00
96 *B. borstelensis* FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌）	82.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
97 *B. amyloliquefaciens* FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌）	88.84	25.30	0.00	40.04	0.00	0.00
98 *B. firmus* FJAT-8764（坚强芽胞杆菌）	97.25	9.20	0.00	25.57	0.00	0.00
99 *V. arvi* FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌）	100.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
100 *B. subtilis* sp.*izizenii* FJAT-8784（枯草芽胞杆菌斯氏亚种）	109.60	3.10	0.00	22.27	0.00	0.00
101 *P. curdlanolyticu*s FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌）	117.10	5.10	11.19	15.46	0.00	0.00
102 *B. pasteurii* FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌）	129.32	0.00	0.00	23.61	0.00	0.00
103 *P. chitinolyticus* FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌）	140.17	10.77	0.00	0.00	11.04	0.03
104 *G. thermodenitrificans* FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌）	157.18	1.91	4.91	15.91	13.03	0.00
105 *B. farraginis* FJAT-10030（混料芽胞杆菌）	258.21	0.00	0.00	0.00	10.23	0.00

续表

菌株名称	A	B	C	D	E	F
106 *B. funiculus* FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌）	335.57	0.00	0.00	0.00	10.31	0.00
107 *B. mojavensis* FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌）	351.79	0.05	13.83	17.06	0.00	0.00
108 *B. altitudinis* FJAT-10025（高地芽胞杆菌）	382.95	0.00	25.60	7.92	0.00	0.00
109 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种）	390.22	0.60	27.58	31.06	0.00	0.00
110 *B. carboniphilus* FJAT-10029（嗜碳芽胞杆菌）	398.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
111 *B. endophyticus* FJAT-10010（内生芽胞杆菌）	399.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
112 *P. polymyxa* FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌）	422.20	0.00	21.41	0.00	0.00	0.00
113 *B. selenitireducens* FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌）	437.82	0.00	0.00	4.88	0.00	0.00
114 *L. sphaericus* FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌）	505.28	4.10	0.00	16.06	0.00	0.06
115 *B. subterraneus* FJAT-14271（地下芽胞杆菌）	518.30	0.00	24.62	19.19	0.00	0.00
116 *B. koreensis* FJAT-14210（韩国芽胞杆菌）	579.79	10.72	1.90	0.00	0.00	0.00
117 *B. pumilus* FJAT-8779（短小芽胞杆菌）	18 249.82	0.00	28.50	11.05	0.00	0.00
118 *B. safensis* FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）	24 597.65	0.00	32.32	9.67	0.00	0.00
合计	49 087.2	345.17	692.92	786.68	121.33	0.76

注：A 为木聚糖酶活性（U/ml）；B 为普鲁兰酶活性（U/ml）；C 为蛋白酶活性（U/ml）；D 为果胶酶活性（U/ml）；E 为几丁质酶活性（U/ml）；F 为植酸酶活性（U/ml）

2. 产酶芽胞杆菌的比例

芽胞杆菌 118 个菌株中，能产木聚糖酶的菌株有 37 个，木聚糖酶活性范围 1.29～24 597.65U/ml；能产普鲁兰酶的菌株有 46 个，普鲁兰酶活性范围 0.05～17.14U/ml；能产蛋白酶的菌株有 52 个，蛋白酶活性范围 0.07～23.47U/ml；能产果胶酶的菌株有 41 个，果胶酶活性范围 4.88～46.32U/ml；能产几丁质酶的菌株有 9 个，几丁质酶活性范围 10.23～14.85U/ml；能产植酸酶的菌株有 15 个，植酸酶活性范围 0.01～0.14U/ml。

3. 相同芽胞杆菌产酶特性不同

同种不同菌株的芽胞杆菌，产酶特性差异很大，如解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)不产木聚糖酶，*B. amyloliquefaciens* FJAT-8754 木聚糖酶活性达 88.84U/ml（表 2-25）。

表 2-25　解淀粉芽胞杆菌不同菌株的产酶特性

菌株编号	A	B	C	D	E	F
B. amyloliquefaciens FJAT-2349（解淀粉芽胞杆菌）	0.00	42.27	30.79	31.06	0.00	0.00
B. amyloliquefaciens FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌）	88.84	25.30	0.00	40.04	0.00	0.00

注：A 为木聚糖酶活性（U/ml）；B 为普鲁兰酶活性（U/ml）；C 为蛋白酶活性（U/ml）；D 为果胶酶活性（U/ml）；E 为几丁质酶活性（U/ml）；F 为植酸酶活性（U/ml）

枯草芽胞杆菌的不同亚种，产酶特性差异很大，如枯草芽胞杆菌斯氏亚种木聚糖酶活性达 109.60U/ml，枯草芽胞杆菌因氏亚种木聚糖酶活性达 390.22U/ml，枯草亚种木聚糖酶活性为 0U/ml（表 2-26）。

表 2-26 枯草芽胞杆菌不同亚种的产酶特性

菌株编号	A	B	C	D	E	F
B. subtilis sp. *izizenii* FJAT-8784（枯草芽胞杆菌斯氏亚种）	109.60	3.10	0.00	22.27	0.00	0.00
B. subtilis subsp. *inaquosorum* FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种）	390.22	0.60	27.58	31.06	0.00	0.00
B. subtilis subsp. *subtilis* FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种）	0.00	17.86	12.80	23.07	0.00	0.01

注：A 为木聚糖酶活性（U/ml）；B 为普鲁兰酶活性（U/ml）；C 为蛋白酶活性（U/ml）；D 为果胶酶活性（U/ml）；E 为几丁质酶活性（U/ml）；F 为植酸酶活性（U/ml）

土壤短芽胞杆菌的不同菌株，产酶特性差异很大，如 *B. agri* FJAT-10018 产蛋白酶活性达 3.32U/ml，*B. agri* FJAT-8790 不产蛋白酶（表 2-27）。

表 2-27 土壤短芽胞杆菌不同菌株的产酶特性

菌株编号	A	B	C	D	E	F
B. agri FJAT-10018（土壤短芽胞杆菌）	0.00	0.00	3.32	0.00	0.00	0.00
B. agri FJAT-8790（土壤短芽胞杆菌）	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05

注：A 为木聚糖酶活性（U/ml）；B 为普鲁兰酶活性（U/ml）；C 为蛋白酶活性（U/ml）；D 为果胶酶活性（U/ml）；E 为几丁质酶活性（U/ml）；F 为植酸酶活性（U/ml）

4. 芽胞杆菌产酶能力分析

对 118 个芽胞杆菌产生的 6 种酶，逐个进行总和统计，结果见表 2-28。可以看出芽胞杆菌产木聚糖酶能力最强，总酶活性达 49 087.2U/ml，随后按产酶能力大小排序为果胶酶(786.68U/ml)>蛋白酶(692.92U/ml)>普鲁兰酶(345.17U/ml)>几丁质酶(121.33U/ml)>植酸酶（0.76U/ml）。

表 2-28 芽胞杆菌产酶能力分析 （单位：U/ml）

项目	木聚糖酶	果胶酶	蛋白酶	普鲁兰酶	几丁质酶	植酸酶
合计	49 087.2	786.68	692.92	345.17	121.33	0.76

六、基于产酶特性芽胞杆菌的聚类分析

根据表 2-24，以产酶为指标，以菌株为样本，构建矩阵，其中 *B. pumilus* FJAT-8779 和 *B. safensis* FJAT-14260 木聚糖酶活性非常高，大于 18 000U/ml，将其排除在聚类分析之外。以欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类，分析结果见图 2-14。可将其分为 4 类。

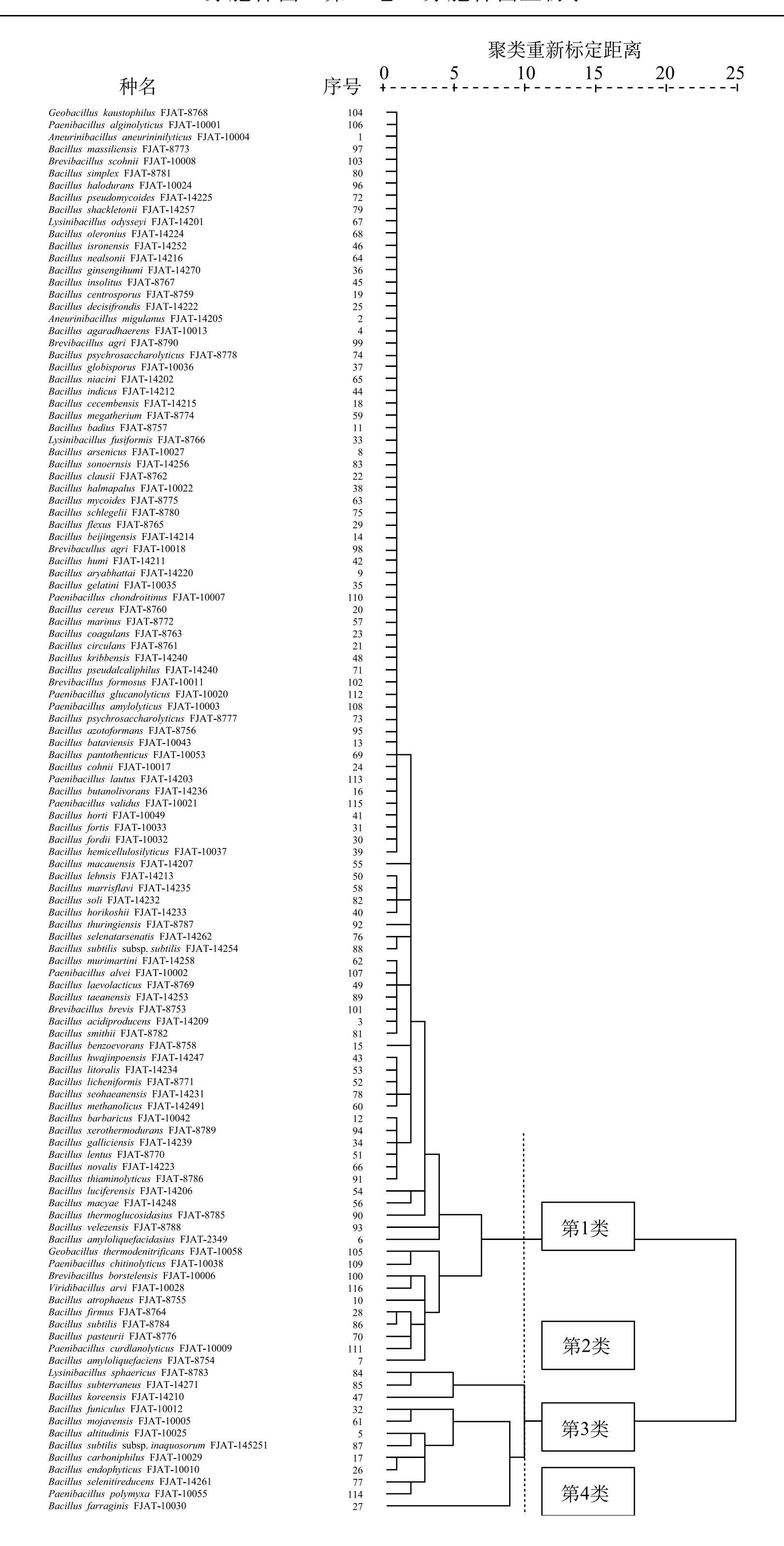


图 2-14　基于产酶特性的芽胞杆菌聚类分析

第 1 类含有 104 个菌株，特点为木聚糖酶活性小于 157.18U/ml，包括 *A. aneurinilyticus* FJAT-10004、*A. migulanus* FJAT-14205、*B. acidiproducens* FJAT-14209、*B. agaradhaerens* FJAT-10013、*B. amyloliquefaciens* FJAT-2349、*B. amyloliquefaciens* FJAT-8754、*B. arsenicus* FJAT-10027、*B. aryabhattai* FJAT-14220、*B. atrophaeus* FJAT-8755、*B. badius* FJAT-8757、*B. barbaricus* FJAT-10042、*B. bataviensis* FJAT-10043、*B. beijingensis* FJAT-14214、*B. benzoevorans* FJAT-8758、*B. butanolivorans* FJAT-14236、*B. cecembensis* FJAT-14215、*B. centrosporus* FJAT-8759、*B. cereus* FJAT-8760、*B. circulans* FJAT-8761、*B. clausii* FJAT-8762、*B. coagulans* FJAT-8763、*B. cohnii* FJAT-10017、*B. decisifrondis* FJAT-14222、*B. firmus* FJAT-8764、*B. flexus* FJAT-8765、*B. fordii* FJAT-10032、*B. fortis* FJAT-10033、*L. fusiformis* FJAT-8766、*B. galliciensis* FJAT-14239、*B. gelatini* FJAT-10035、*B. ginsengihumi* FJAT-14270、*B. globisporus* FJAT-10036、*B. halmapalus* FJAT-10022、*B. hemicellulosilyticus* FJAT-10037、*B. horikoshii* FJAT-14233、*B. horti* FJAT-10049、*B. humi* FJAT-14211、*B. hwajinpoensis* FJAT-14247、*B. indicus* FJAT-14212、*B. insolitus* FJAT-8767、*B. isronensis* FJAT-14252、*B. kribbensis* FJAT-14240、*B. laevolacticus* FJAT-8769、*B. lehensis* FJAT-14213、*B. lentus* FJAT-8770、*B. licheniformis* FJAT-8771、*B. litoralis* FJAT-14234、*B. luciferensis* FJAT-14206、*B. macauensis* FJAT-14207、*B. macyae* FJAT-14248、*B. marinus* FJAT-8772、*B. marisflavi* FJAT-14235、*B. megatherium* FJAT-8774、*B. methanolicus* FJAT-14249、*B. murimartini* FJAT-14258、*B. mycoides* FJAT-8775、*B. nealsonii* FJAT-14216、*B. niacini* FJAT-14202、*B. novalis* FJAT-14223、*L. odysseyi* FJAT-14201、*B. oleronius* FJAT-14224、*V. pantothenticus* FJAT-10053、*B. pasteurii* FJAT-8776、*B. pseudalcaliphilus* FJAT-14237、*B. pseudomycoides* FJAT-14225、*B. psychrosaccharolyticus* FJAT-8777、*B. psychrosaccharolyticus* FJAT-8778、*B. schlegelii* FJAT-8780、*B. selenatarsenatis* FJAT-14262、*B. seohaeanensis* FJAT-14231、*B. shackletonii* FJAT-14257、*B. simplex* FJAT-8781、*B. smithii* FJAT-8782、*B. soli* FJAT-14232、*B. sonoernsis* FJAT-14256、*B. subtilis* subsp. *izizenii* FJAT-8784、*B. subtilis* subsp. *subtilis* FJAT-14254、*B. taeanensis* FJAT-14253、*G. thermoglucosidasius* FJAT-8785、*P. thiaminolyticus* FJAT-8786、*B. thuringiensis* FJAT-8787、*B. velezensis* FJAT-8788、*B. xerothermodurans* FJAT-8789、*B. azotoformans* FJAT-8756、*B. halodurans* FJAT-10024、*B. massiliensis* FJAT-8773、*B. agri* FJAT-10018、*B. agri* FJAT-8790、*B. borstelensis* FJAT-10006、*B. brevis* FJAT-8753 、*B. formosus* FJAT-10011、*B. scohnii* FJAT-10008、*G. kaustophilus* FJAT-8768、*G. thermodenitrificans* FJAT-10058、*P. Alginolyticus* FJAT-10001、*P. alvei* FJAT-10002、*P. amylolyticus* FJAT-10003、*P. chitinolyticus* FJAT-10038、*P. chondroitinus* FJAT-10007、*P. curdlanolyticus* FJAT-10009、*P. glucanolyticus* FJAT-10020、*P. validus* FJAT-10021、*V. arvi* FJAT-10028、*P. lautus* FJAT-14203。

第 2 类含有 3 个菌株，其特点为木聚糖酶活性大于 505.28U/ml，包括 *L. sphaericus* FJAT-8783、*B. subterraneus* FJAT-14271、*B. koreensis* FJAT-14210。

第 3 类含有 8 个菌株，其特点为木聚糖酶活性为 300～400U/ml，包括 *P. polymyxa* FJAT-10055、*B. altitudinis* FJAT-10025、*B. carboniphilus* FJAT-10029、*B. endophyticus*

FJAT-10010、*B. funiculus* FJAT-10012、*B. mojavensis* FJAT-10005、*B. selenitireducens* FJAT-14261、*B. subtilis* subsp. *inaquosorum* FJAT-14251。

第4类含有一个菌株，为*B. farraginis* FJAT-10030，其特点为木聚糖酶活性为250U/ml左右。

七、基于芽胞杆菌的产酶特性聚类分析

根据表2-24，以产酶为样本，以菌株为指标，构建矩阵，以相关系数为尺度，用类平均法进行系统聚类，分析结果见图2-15。相关系数见表2-29。芽胞杆菌的普鲁兰酶、蛋白酶、果胶酶之间相关系数在0.2以上，它们之间显著相关。其他酶之间，无显著相关性。聚类分析结果可将其分为3类：第1类包含3个酶，即普鲁兰酶、蛋白酶、果胶酶。第2类包含一个酶，木聚糖酶。第3类包含两个酶，即几丁质酶、植酸酶。

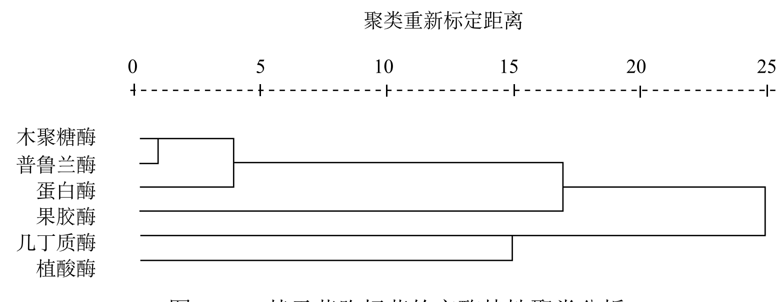


图2-15　基于芽胞杆菌的产酶特性聚类分析

表2-29　基于芽胞杆菌的产酶特性相关系数

酶类	A	B	C	D	E	F
A	1.0000	−0.0331	0.1237	0.1129	0.0615	−0.0157
B	−0.0331	1.0000	0.2231	0.2895	−0.0463	−0.0309
C	0.1237	0.2231	1.0000	0.2719	−0.1345	−0.0999
D	0.1129	0.2895	0.2719	1.0000	−0.0950	0.0459
E	0.0615	−0.0463	−0.1345	−0.0950	1.0000	0.0949
F	−0.0157	−0.0309	−0.0999	0.0459	0.0949	1.0000

注：A为木聚糖酶；B为普鲁兰酶；C为蛋白酶；D为果胶酶；E为几丁质酶；F为植酸酶

第四节　芽胞杆菌纤维素酶和淀粉酶的酶学特性

一、概述

来源于不同微生物的同一种酶的生物学特性大多存在异同之处，杨柳等（2008）从土壤中分离得到的一株解淀粉芽胞杆菌YL07所产的纤维素酶，反应的最适pH为6.0～7.0，在6.0～9.0时酶活稳定性较好，反应最适温度为40℃，K^+、Ca^{2+}促进CMCase酶反应，Fe^{2+}、Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}对FPase有激活作用；而Lee等（2008）从土壤中分离的一株解淀粉芽胞杆菌DL-3，其纤维素酶的最适反应pH为7.0、最适反应温度为50℃。

采用前人对生物酶酶学特性的研究手段，以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 为例，研究其纤维素酶、淀粉酶的反应 pH、pH 稳定性、反应温度、热稳定性以及金属离子对酶反应的影响，阐明芽胞杆菌的纤维素酶、淀粉酶的酶学特性。

二、研究方法

1. 材料

菌株采用本研究室分离的解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754。基础培养基采用 LB 固体培养基和 LB 液体培养基。发酵培养基：玉米淀粉 10g、豆粕 10g、NaCl 5.0g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5g、$KH_2PO_4·2H_2O$ 0.5g、$K_2HPO_4·2H_2O$ 0.5g、$CaCl_2$ 0.2g、蒸馏水 1000ml，pH 6.5，在 121℃条件下灭菌 20min。

2. 方法

（1）纤维素酶和淀粉酶最适反应 pH 及 pH 稳定性

用柠檬酸缓冲液配置 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 的底物溶液，在 50℃测定纤维素酶活性、40℃测定淀粉酶活性，确定纤维素酶和淀粉酶的最适反应 pH。将粗酶液用不同 pH 缓冲液适当稀释，并在 4℃冰箱中放置 12h。以纯水稀释的粗酶液为对照组（相对酶活性为 100%），分别测定不同缓冲液处理后解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的相对酶活性。

（2）纤维素酶和淀粉酶最适反应温度及热稳定性

在确定最适反应 pH 条件下，测定不同反应温度（40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃）时酶活性，确定解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的最适反应温度。将纤维素酶粗酶液放置于 50℃、60℃中保温，淀粉酶粗酶液放置于 60℃、65℃中保温，各自保温 0min、20min、40min、60min、90min、120min、150min，按时间编号取出样品，放于 4℃冰箱保存，待取样结束后一并测定纤维素酶和淀粉酶的残留酶活，并以保温 0min 实验组纤维素酶活、淀粉酶的残留酶活性为 100%。

（3）重金属离子对纤维素酶和淀粉酶酶活的影响

粗酶液适当稀释，在纤维素酶和淀粉酶各自最适反应 pH、最适反应温度条件下，添加等量的金属离子溶液，使反应体系中金属离子的浓度为 1mmol/L、10mmol/L，然后进行保温反应，测定金属离子对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶反应的影响。以添加等量纯水组为对照组，其纤维素酶和淀粉酶的相对酶活性为 100%。

（4）多元醇对纤维素酶和淀粉酶热稳定性的影响

粗酶液中添加等量的 4%的甘油、吐温、山梨醇、聚乙烯醇、聚乙二醇 4000、聚乙二醇 8000、甘露醇溶液，然后 55℃/60℃保温 2h。适当稀释粗酶液，在纤维素酶和淀粉酶各自最适反应 pH、最适反应温度条件下测定解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的残留酶活，以对照组残留酶活为 100%。

（5）纤维素酶和淀粉酶的酶促动力学研究

在解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶各自最适反应 pH、反应温度条件

下，加入等量的不同浓度的底物反应 5min。利用 Lineweaver-Burk 双倒数公式（2-10），计算出纤维素酶和淀粉酶各自的最大反应速度（V_{max}）、米氏常数（K_m）。

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_m}\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_m} \tag{2-10}$$

式中，V_m为最大反应速度；K_m为米氏常数；V为酶促反应速度；[S]为底物浓度。

三、芽胞杆菌纤维素酶和淀粉酶最适反应 pH 及 pH 稳定性

1）最适反应 pH。在测定纤维素酶和淀粉酶酶活性中，加入不同 pH 的缓冲溶液，分别测定纤维素酶和淀粉酶的酶活性。结果见图 2-16，解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶在 pH4.0～7.5 均能表现出明显的活性。且在 pH5.5 时解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的活性均最高，在 pH5.0 时纤维素酶活性维持 90%以上、淀粉酶活性显得偏低一些；在 pH6.5 时纤维素酶和淀粉酶酶活性均在 73%以上。在 pH4.5～6.5 的缓冲液条件下 4℃放置 12h 后，按常规方法测定解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的残留酶活性。

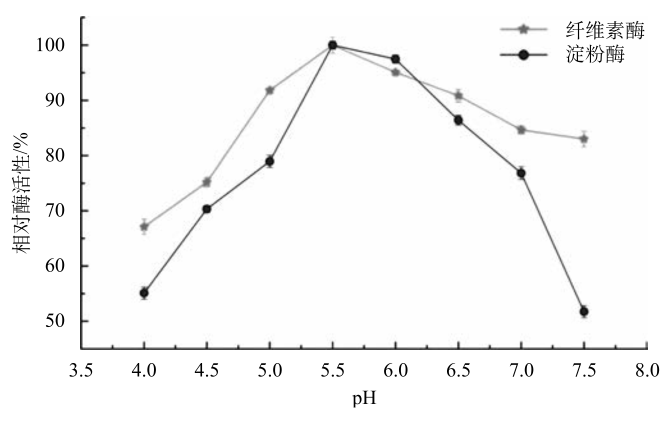


图 2-16　pH 对纤维素酶和淀粉酶酶活性的影响

2）在 pH 下的稳定性。从实验结果（图 2-17）可知，纤维素酶和淀粉酶在 pH3.5～

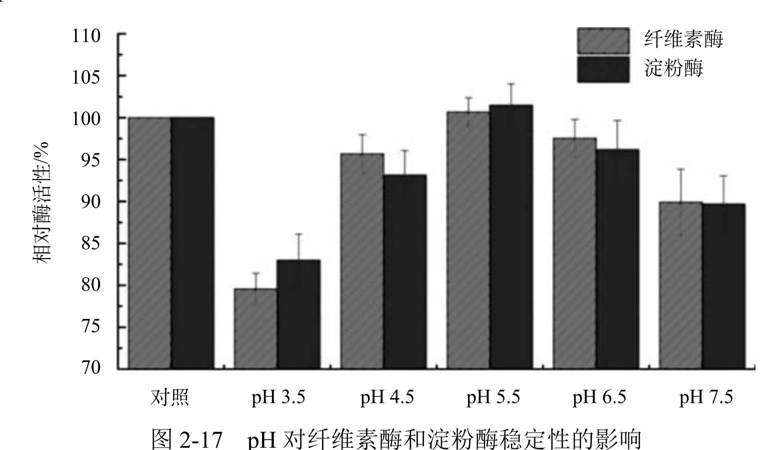


图 2-17　pH 对纤维素酶和淀粉酶稳定性的影响

7.5 的条件下仍然保存很好的酶活性，其中在 pH5.5 缓冲液条件下纤维素酶和淀粉酶的稳定性最好。实验结果表明，解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的最适反应 pH 均为 5.5，且在 pH5.5 的缓冲液条件下两种酶的稳定性也最好。

四、芽胞杆菌纤维素酶和淀粉酶最适反应温度及热稳定性

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的最适 pH 缓冲液配置底物，粗酶液适当稀释后分别在 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃的温度条件下测定纤维素酶和淀粉酶的酶活性，以各自最高酶活为 100%，结果见图 2-18。解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶在 50℃时酶活性最高、淀粉酶在 55℃时酶活性最高，在 40～65℃条件下两种酶均表现出较高的酶活，酶活性均能达 60%以上。将解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶放置在 55℃和 60℃、淀粉酶粗酶液放置在 60℃和 65℃条件下保温 0min、20min、40min、60min、90min、120min、150min，保温结束后立刻取出 4℃冷却，按常规方法测定纤维素酶和淀粉酶的残留酶活，以保温 0min 的酶活性为 100%，实验结果见图 2-19 和图 2-20。

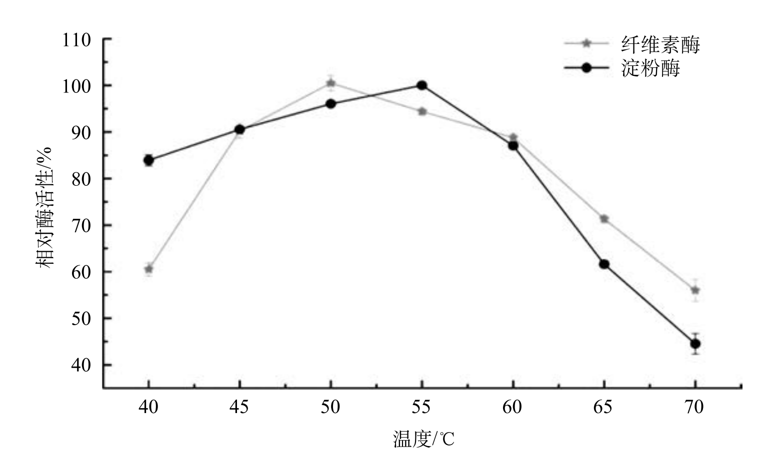


图 2-18　反应温度对纤维素酶和淀粉酶反应速度的影响

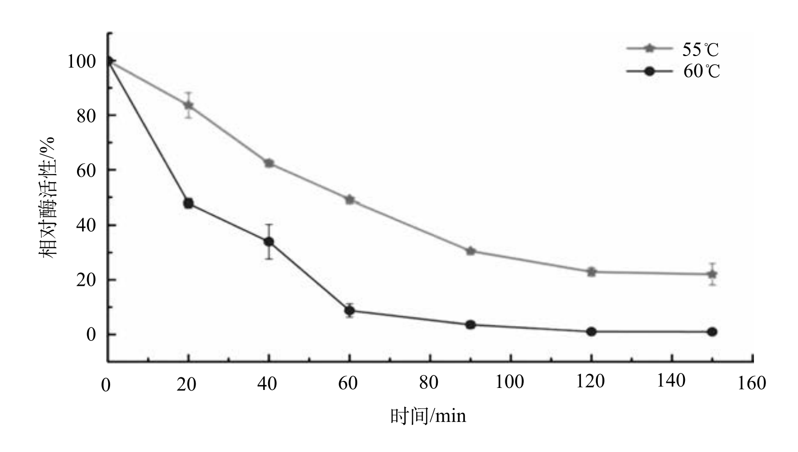


图 2-19　温度对纤维素酶稳定性的影响

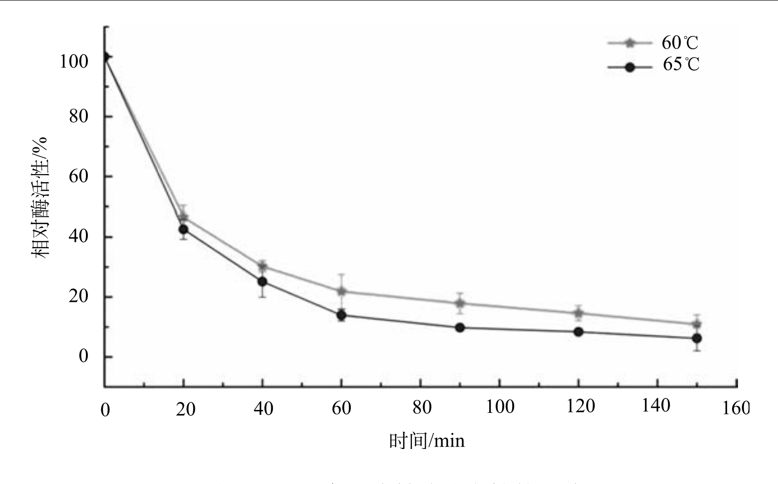


图 2-20　温度对淀粉酶稳定性的影响

由图 2-19 可知解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶在 55℃和 60℃保温条件下随时间的延长，纤维素酶活性明显下降，在 60℃条件下酶活性下降趋势明显快于 55℃条件下。在 55℃条件下保温 60min 后，残留酶活在 50%以上；而在 60℃条件下保温 40min 后酶活性低于 40%。

解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 淀粉酶的稳定性见图 2-20。淀粉酶在 60℃和 65℃条件下保温，随保温时间的延长淀粉酶活性急剧下降：在 60℃、65℃条件下保温 40min 时，淀粉酶的残留酶活性均低于 40%，而保温 90min 后淀粉酶的残留酶活均不到 20%，由此可知解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 淀粉酶的热稳定性能较差。

五、金属离子对芽胞杆菌纤维素酶和淀粉酶酶活性的影响

在酶促反应过程中，很多金属离子参与其中，因此研究金属离子对酶活性的影响具有重要意义。在解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶酶活反应测定体系中加入等量的金属离子，使反应体系中金属离子的浓度分别为 1mmol/L、10mmol/L。以加等量纯水为对照组，纤维素酶和淀粉酶酶活性均为 100%。实验结果见图 2-21 和图 2-22。

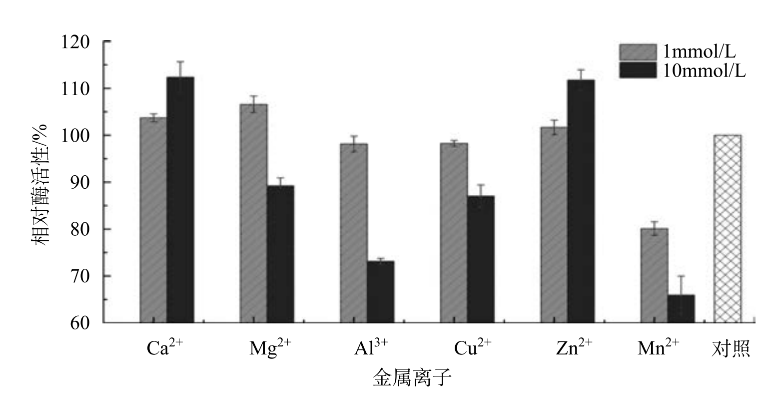


图 2-21　金属离子对纤维素酶反应的影响

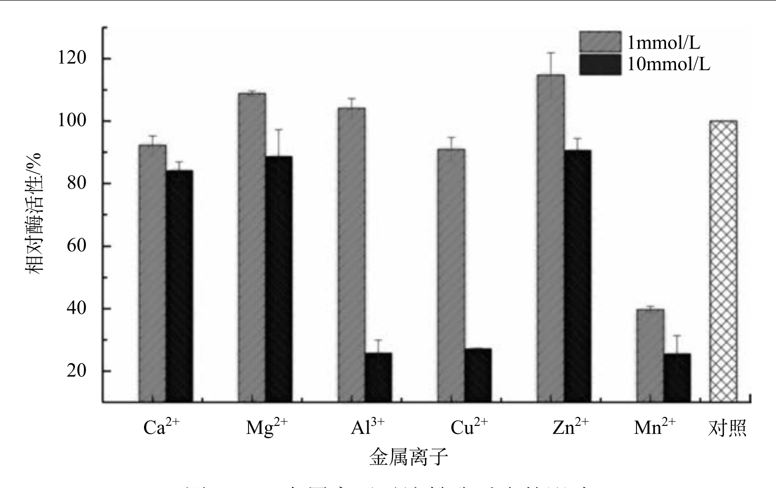


图 2-22　金属离子对淀粉酶反应的影响

从图 2-21 可知，低浓度的金属离子（除 Mn^{2+}外）对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶酶促反应没有明显的促进或抑制作用；高浓度的 Ca^{2+}、Zn^{2+}对纤维素酶有明显的促进作用，酶活均比对照组高出 12%；而高浓度的 Mg^{2+}、Al^{3+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}对纤维素酶有抑制作用，其中 Mn^{2+}的抑制作用最显著。

金属离子对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 淀粉酶酶促反应的影响见图 2-22。从图中可看出，低浓度的 Mg^{2+}、Al^{3+}、Zn^{2+}对淀粉酶酶促反应有促进作用，其中 Zn^{2+}的促进作用最明显，淀粉酶活性比对照组高出了 14%；低浓度的 Ca^{2+}、Cu^{2+}对淀粉酶酶促反应有微弱的抑制作用；高浓度的金属离子明显抑制了解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 淀粉酶酶促反应；低浓度和高浓度的 Mn^{2+}对淀粉酶酶促反应抑制作用均很显著（图 2-22）。

六、多元醇对芽胞杆菌纤维素酶和淀粉酶热稳定性的影响

在解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 发酵粗酶液中添加 4%的甘油、吐温、山梨醇、聚乙烯醇、聚乙二醇 4000、聚乙二醇 8000、甘露醇溶液，其他条件不变，分别测定纤维素酶和淀粉酶的酶活性，以对照组酶活性为 100%，结果见图 2-23，甘露醇、山梨醇对解淀

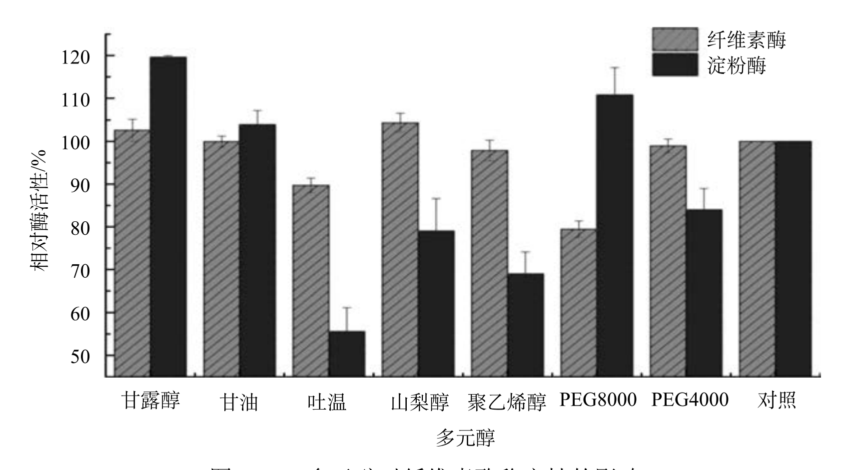


图 2-23　多元醇对纤维素酶稳定性的影响

粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶热稳定性具有一定的作用，甘露醇、甘油、聚乙二醇 8000 对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 淀粉酶也具有保护作用，而其中山梨醇对纤维素酶、甘露醇对淀粉酶的热稳定性保护效果最为明显。综合考虑，选用甘露醇作为解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 复合酶的稳定剂。

七、芽胞杆菌纤维素酶和淀粉酶的酶促动力学

以 Linewear-Burk 作图法分别得到纤维素酶米氏方程为 y=15.0189x+19.4619（图 2-24），淀粉酶米氏方程为 y=0.179 84x+29.8341（图 2-25）。根据各自的米氏方程求得纤维素酶的最大反应速度 v_{max} 为 5.14×10^{-3}mg/（ml·min），米氏常数 K_m 为 7.71×10^{-1}mg/ml；淀粉酶的最大反应速度 v_{max} 为 3.35×10^{-2}mg/（ml·min），米氏常数 K_m 为 6.03×10^{-3}mg/ml。

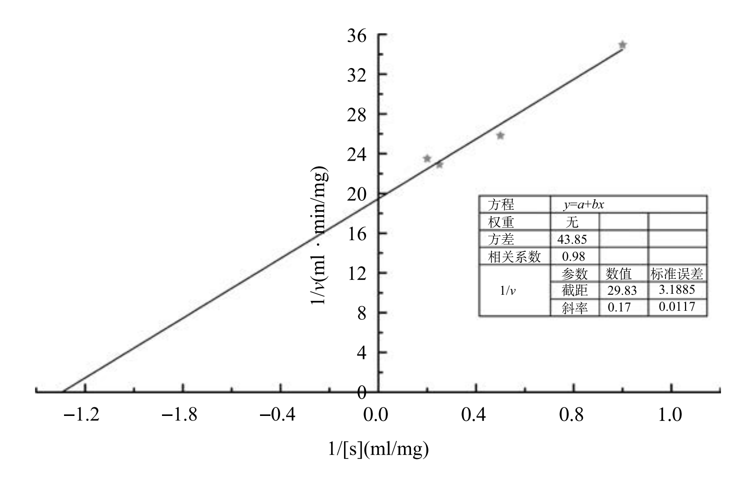


图 2-24　纤维素酶酶促动力学

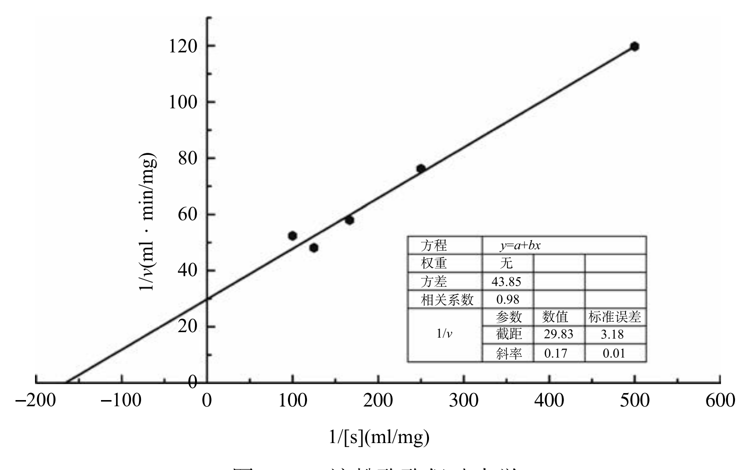


图 2-25　淀粉酶酶促动力学

八、讨论

1. pH 对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的影响

pH 对酶活的影响主要有以下几点：pH 影响底物的解离状态，使底物不能与酶结合或者结合后不能产生产物；影响酶分子的某些基团或者是催化结构域，从而改变酶的构象，使底物不能与酶结合或发生催化反应；影响中间络合物的解离状态，使催化反应的产物无法脱离催化结构域。解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶最适 pH 均为 5.0，在 pH 3.5～7.0 时两种酶都表现明显的酶活性，表明解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶复合酶为酸性复合酶，能在酸性环境中发挥酶活性，符合作为饲料添加剂的要求。与已报道的纤维素酶和淀粉酶的 pH 稳定性相比，解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶耐受范围较宽，稳定性较好。

2. 温度对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的影响

温度对酶活的影响主要表现在两方面：①温度升高，酶促反应速度加快；②由于酶是蛋白质，随着温度的升高，酶逐渐变性甚至失活，从而引起酶促反应速度的迅速下降。酶促反应的最适温度是这两个因素的一个综合影响结果。李志鹏（2009）研究的中温 α-淀粉酶解淀粉芽胞杆菌最适反应温度为60℃，而在60℃保温30min后残留酶活不到55%。本研究中，解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的最适反应温度分别为 50℃、55℃，但此两种酶的热稳定性较差。这与大多报道的芽胞杆菌所产的中温纤维素酶和淀粉酶的最适温度相近。

3. 金属离子对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的影响

在酶促反应过程中，金属离子可能通过以下几个方面影响酶促反应的进行：①参与酶促催化反应，传递电子；②在酶与底物间起桥梁作用；③稳定酶的构象。Wang 等（2012）研究金属离子及非金属离子对纤维素酶的影响，结果表明 Al^{3+}具有非竞争性抑制、Mg^{2+}具有竞争性抑制作用，酸根离子（Cl^-、CH_3COO^-、SO_4^{2-}）对其也有抑制作用。Burhan 等（2003）对 *Baillus* sp. ANT-6 的淀粉酶酶活性进行研究，结果显示：本研究中，5mmol/L 的 Ca^{2+}、3mmol/L 的 PMSF 对该淀粉酶有促进作用，而 5mmol/L 的 Zn^{2+}和 Na^+、10mmol/L 的 EDTA 对该淀粉酶有抑制作用。本研究中，Ca^{2+}、Zn^{2+}及低浓度的 Mg^{2+}对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶酶促反应起促进作用，而 Al^{3+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}为抑制剂，这与文献中报道的 Ca^{2+}、Mg^{2+}对纤维素酶酶促反应起促进作用相同（Wang *et al.*，2012；吕静琳等，2009；Demirkan *et al.*，2005）；低浓度的 Mg^{2+}、Al^{3+}、Zn^{2+}为解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 淀粉酶的促进剂，Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}为抑制剂。

4. 稳定剂对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶和淀粉酶的影响

多元醇、糖类、氨基酸及其衍生物、多聚物、无机盐等一般被称为蛋白质的共溶剂，共溶剂改变了溶液的热力学性质，使得酶在溶剂中稳定存在（赵珊，2008）。本研究中，

甘露醇可能促进了酶分子形成“溶剂层”，增加酶分子的表面张力和溶液黏度，降低蛋白质水解而稳定酶的作用或者降低了介质的介电常数，增加了酶分子的疏水作用，进而提高了纤维素酶和淀粉酶的稳定性。甘油、甘露醇、山梨醇、聚乙二醇 4000 等在结构和分子大小上存在不同，对纤维素酶和淀粉酶的稳定性影响也不同，而综合比较甘露醇对复合酶的保护作用最好，可见稳定剂的分子大小和结构在稳定酶的构象中均起重要作用。

第五节　芽胞杆菌产蛋白酶特性

一、概述

芽胞杆菌产蛋白酶的能力较强，国内研究过产蛋白酶芽胞杆菌的种类有 7 种，综述如下。

（1）侧胞短芽胞杆菌（*B. laterosporus*）

采用单因素试验确定侧胞短芽胞杆菌 G4 产线虫侵染性蛋白酶的最佳碳氮源，通过 Plackett-Burman 设计筛选影响蛋白酶活性的主效因子，最陡爬坡试验和 Box-Behnken 设计获得主效因子的最佳水平，建立线虫侵染性蛋白酶的最佳生产体系：葡萄糖 9.78g/L、牛肉膏 16.65g/L、磷酸氢二钾 0.75g/L、可溶性淀粉 12.5g/L、氯化钠 0.75g/L、硫酸镁 0.5g/L、初始 pH 自然，装液量 50ml，37℃摇瓶培养 32h，蛋白酶活性可达 12 379.41U/ml，较优化前的 2476.3U/ml 提高了 5 倍（柯崇榕等，2010）。

（2）地衣芽胞杆菌（*B. lincheniformis*）

根据蛋白基因产物——A 蛋白与许多动物的免疫蛋白的 Fc 段特异结合这一特性，应用 ELISA 检测方法，测定 A 蛋白基因在地衣芽胞杆菌 NM105 中的表达情况，进而研究外蛋白酶对外源基因表达的影响（张尤新和王桂忱，1997）。

（3）短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）

通过 L_9（3^4）正交试验确定产脱毛蛋白酶菌株 *B. pumilus* UN-31-C-42 的最佳产酶条件为：温度 34℃，pH7.0，发酵时间 48h；结果表明该菌株对藏系羊蹄具有良好的脱毛效果，最佳脱毛时间为 24h（张红见等，2010）。

（4）环状芽胞杆菌（*B. circulans*）

用枯草芽胞杆菌质粒载体 pNQ122 和含中性蛋白酶基因的重组质粒 pMPR8 转化环状芽胞杆菌 C-2，转化频率为 1.0×10^3 转化子/μg DNA，含有 pMPR8 的转化子能在酪蛋白平板上形成清晰的水解圈，其蛋白酶活性与相同质粒转化枯草芽胞杆菌 DB104 所得酶活性相近，Southern 杂交结果证实了转化细胞中存在质粒 pNQ122 和 pMPR8，两种质粒在该菌中的稳定性差别很大（肖郁明和张义正，1996）。

（5）解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）

通过对筛选的产碱性蛋白酶菌株进行形态观察、生理生化实验和 16S rDNA 序列分析鉴定，确定高活力菌株为解淀粉芽胞杆菌。对发酵碳源、氮源和金属盐进行优化，确定优化培养组分。对接种体积分数、培养温度和培养 pH 进行研究，确定最佳培养条件。在最优条件下培养 18h 后获得最大酶活性为 395.18U/ml，产酶能力比优化前提高了 2.55

倍。该研究为深入研究工业发酵生产碱性蛋白酶提供了参考（程仕伟等，2012）。

（6）巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）

对一株巨大芽胞杆菌 JSSW-JD 的产胞外酶特性及发酵条件进行了研究。结果显示：巨大芽胞杆菌 JSSW-JD 具有较强的产胞外淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶的能力，在酶活鉴别培养基上能产生明显的分解圈，48h 透明圈与菌落面积比分别为 3.87（淀粉酶）、4.38（蛋白酶）、31.42（纤维素酶），但未显示产脂肪酶的能力。优化培养基为玉米淀粉 10.0g/L，豆粕 10.0g/L，NaCl 5.0g/L，K_2HPO_4 2.0g/L，$CaCO_3$ 2.0g/L，优化后培养条件为初始 pH7.0，培养温度 30℃，250ml 三角瓶装液体积为 25ml，接种量 5.0%，摇床转速 200r/min，根据优化条件，在 $2m^3$ 罐中扩大培养芽胞数可达 3.8×10^9CFU/ml，芽胞率达 97.4%（匡群等，2012）。

（7）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

鉴定弹性蛋白酶产生菌株 EL32，确定该酶的基本结构。采用分子生物学、形态学及生理生化性质对菌株 EL32 进行鉴定；用硫酸铵沉淀、离子交换层析和分子筛层析纯化酶蛋白；借助肽指纹图谱及酶基因克隆技术研究该酶的一级结构；利用同源建模的方法研究该酶的空间结构。菌株 EL32 的 16S rDNA 与枯草芽胞杆菌 16S rDNA 的同源性达 99%，其菌落呈乳白色，其细胞革兰氏染色阳性，具有芽胞；发酵葡萄糖试验产酸不产气，明胶水解试验呈阳性，能够水解淀粉，V-P 反应呈阳性，鉴定为枯草芽胞杆菌。从菌株BL32发酵液中纯化得到了弹性蛋白酶，SDS-PAGE分析显示其相对分子质量为31。TQ-MS 测定肽指纹图谱表明，该弹性蛋白酶是枯草芽胞杆菌蛋白酶，该酶的基因和蛋白质序列与枯草芽胞杆菌蛋白酶 subtilisin 的同源性高达 99%。菌株 EL32 弹性蛋白酶的三维结构含有 6 个 α 螺旋，7 个扭曲的平行 β 折叠以及两个反平行的 β 折叠，His、Asp 和 Ser 是其活性中心的关键基团。鉴定了一株产弹性蛋白酶的枯草芽胞杆菌，确定了其弹性蛋白酶是蛋白酶 subtilisin，为该枯草芽胞杆菌蛋白酶的应用提供了基础（王超等，2012）。从鲜牛奶中筛选一株对番茄灰霉病菌具有拮抗作用的菌株 A9，经 16S rDNA 序列分析，鉴定为枯草芽胞杆菌。抑菌特性研究表明，该菌株代谢产物会造成番茄灰霉病菌菌丝畸形，同时抑制其孢子生长，使孢子细胞壁破裂；代谢粗提物经过 DEAE-52 离子交换层析及 Sephadex-G50 凝胶柱层析后，电泳检测到具有抑菌活性且分子质量约为 17ku 的单一条带，经验证该抑菌物具有蛋白酶活性（任杰和吕淑霞，2010）。研究从健康鸡体内分离、选育出一株可产中性蛋白酶的枯草芽胞杆菌；将其作为益生素生产菌种，制备了微生态制剂——益生素；并对该菌的生物学性状、产酶性状和饲喂效果进行了系统研究。研究表明该枯草芽胞杆菌培养 48h，培养液中蛋白酶活性可达 1032.56U/ml；肉用仔鸡的累积饲料转化率提高 8.96%。对肉用仔鸡，合适的添加剂量为 0.1%（*w/w*）（含 H1 菌 7.10×10^5CFU/g 饲料）（常维山等，2003）。角蛋白酶是一种具有将羽毛酶解为短肽和氨基酸潜力的特殊蛋白酶，对提高羽毛等废弃蛋白质资源的循环利用具有重要价值。芽胞杆菌产生的角蛋白酶因其分解羽毛能力强且产酶途径易于调控而日益引起重视。Wang 等（2003，2004）克隆了地衣芽胞杆菌 PWD-1 的角蛋白酶基因 *kerA* 并先后在大肠杆菌系统、枯草芽胞杆菌系统和 *B. licheniformis* T399D 中进行了表达（游银伟等，2007）。采用乳酸菌、枯草芽胞杆菌发酵大豆粉，均能有效消除、灭活大豆中胰蛋白酶抑制剂的

活性。乳酸菌发酵未加乳酸菌培养基的大豆粉，乳酸菌接种量为 5%、10%时，胰蛋白酶抑制剂的活性灭活优于 15%的菌种接种量；枯草芽胞杆菌发酵大豆粉，菌种接种量为 5%时，胰蛋白酶抑制剂的活性灭活优于菌种接种量为 10%、15%（孙常灿等，2007）。对一株产蛋白酶的枯草芽胞杆菌（Z5）进行化学诱变，筛选得到一株产较高酶活性、大分子质量蛋白酶的菌株。检测该蛋白酶对底物明胶的分解能力，发现该蛋白酶的分子质量约为 100kDa，还原剂巯基乙醇对其活性的影响较大。在不同温度、不同 pH 处理该蛋白酶后，用茚三酮法测定酶活性，发现该蛋白酶催化反应的最适 pH 为 6，最适温度为 50℃，并且该蛋白酶有较好的热稳定性，70℃处理 10min 仍能保留 50%左右的酶活性。由于此蛋白酶在分子质量及最适 pH 方面均不同于已报道过的枯草芽胞杆菌蛋白酶，推测其为一种新型的蛋白酶（马宏宇等，2010）。研究了不同浓度的金属离子及有机化合物对枯草芽胞杆菌蛋白酶活性的影响：①在 5 种金属离子中，Mg^{2+}、Na^{+}、K^{+}对酶有激活作用，其中 Mg^{2+}浓度为 2mmol/L 时，激活作用最大。随着金属离子浓度的降低，K^{+}和 Na^{+}对酶的激活作用减弱，Ca^{2+}、Zn^{2+}对酶活性有抑制作用。②在 7 种重金属离子中，除 Mn^{2+}对蛋白酶有激活作用外，Cu^{2+}、Pb^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}和 Cr^{6+}均对蛋白酶有抑制作用。③在有机化合物中，半胱氨酸和 EDTA 对酶均有激活作用，且在 20mmol/L 时最为强烈。④Na^{+}-K^{+}、Ca^{2+}-Mg^{2+}和 Cu^{2+}-EDTA 共同作用时对蛋白酶活性均有不同程度的抑制作用（陈营和桂远明，2001a）。从土壤中分离到的 167 株芽胞杆菌中选出一株高产、稳产碱性蛋白酶菌株 A4-3（嗜碱性枯草芽胞杆菌）。该菌株最适产酶条件为蔗糖 6.0g/100ml、豆饼水解液 10.0g/100ml、Na_2HPO_4 0.3g/100ml、 Na_2CO_3 1.0g/100ml，起始 pH9.5。在该条件下，经 37℃振荡培养 48h，酶活性达 2612U/ml（徐威和苏昕，1997）。以超导磁体产生的静态强磁场为基础，以枯草芽胞杆菌为模式生物，通过测定生长曲线、芽胞生成率、蛋白酶表达量、蛋白酶活性等研究静态强磁场条件下微生物性状的变化。强磁场可以影响枯草芽胞杆菌的芽胞形成速率，抑制营养体的死亡；测定菌体生长过程中蛋白酶的含量及碱性蛋白酶和中性蛋白酶的酶活性，发现磁场处理前后蛋白酶的含量没有发生显著性变化，处理组碱性蛋白酶的酶活性明显高于对照组，而中性蛋白酶酶活性则低于对照组。强磁场可以延长枯草芽胞杆菌的世代周期，降低菌体死亡率，对细菌酶活性的影响因酶的种类不同而异（尹焕才等，2008）。旨在研究枯草芽胞杆菌对中华鳖（*Pelodiscus sinensis*）生长性能、肠道消化酶活性和血液生化指标的影响。选用初始体重为（11.96±0.49）g 的中华鳖稚鳖 30 只，随机分成 5 组，每组 2 个重复，每个重复 3 只，分别投喂在基础饲料中添加枯草芽胞杆菌 0g/kg（对照组）、0.5g/kg（Ⅰ组）、1.0g/kg（Ⅱ组）、2.0g/kg（Ⅲ组）和 5.0g/kg（Ⅳ组），试验结束时测定其生长性能、肠道消化酶活性和血液生化指标。结果显示：Ⅱ组和Ⅲ组的增重率和特定生长率均极显著高于对照组、Ⅰ组和Ⅳ组（$P<0.01$），而饲料系数则极显著低于对照组、Ⅰ组和Ⅳ组（$P<0.01$）；各试验组的肠道消化酶活性也均高于对照组，Ⅱ组蛋白酶和淀粉酶活性最高，Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组的淀粉酶活性显著高于对照组和Ⅳ组（$P<0.05$）；各试验组的谷草转氨酶、谷丙转氨酶和肌酸激酶活力及肌酐含量均极显著低于对照组（$P<0.01$），除Ⅲ组外，各试验组乳酸脱氢酶活性均显著或极显著低于对照组（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。除Ⅳ组的总蛋白、球蛋白含量显著低于对照组（$P<0.05$）外，各试验组蛋白质、葡萄糖和脂类含量与对照组均无显著差异（$P>0.05$）。

由此得出，饲料中适量添加枯草芽胞杆菌可以促进中华鳖稚鳖的生长，降低饲料系数，提高肠道淀粉酶和蛋白酶活性，对肝脏、心脏、肾脏和肌肉有保护作用，降低无氧代谢水平。在中华鳖稚鳖饲料中推荐添加 1.0～2.0g/kg（管越强等，2010）。研究了细菌素产生菌枯草芽胞杆菌 FB123 所产细菌素的理化性质及其抑菌谱。枯草芽胞杆菌 FB123 经过 28℃、32h 的发酵得到发酵上清液，用饱和度为 50%的硫酸铵溶液沉淀发酵上清液中的细菌素。以革兰氏阴性菌大肠杆菌和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌为指示菌，采用牛津杯法检测细菌素抑菌活性，对细菌素粗品进行实验，最适作用温度 40℃，具有较宽的 pH 作用范围和较好的热稳定性。各种蛋白酶、金属离子对其活性有不同程度的影响。抑菌谱实验结果表明，该细菌素对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有明显的抑制作用，对部分真菌有抑制作用（罗秀针等，2008）。枯草芽胞杆菌 XF-1 是一株对大白菜根肿病有良好防治效果及对多种植物病原真菌有抑菌效果的生防菌株。为了研究其可能的作用机制，用硫酸铵沉淀法提取了发酵液中粗蛋白质，并在不同处理条件下对其抑菌活性进行了初步研究。该粗蛋白质对蛋白酶 K、胰蛋白酶及紫外线照射均不敏感，60℃、80℃和 100℃处理 20min 后，其抑菌作用基本上无变化；经 121℃处理 20min 后，抑菌活性保持 60%。这些结果为进一步研究菌株 XF-1 对根肿病的防治机制和进一步应用提供了试验依据（熊国如等，2009）。探讨枯草芽胞杆菌突变株 ZC-7 高产中性蛋白酶的原因。用 PCR 方法分别扩增突变株 ZC-7 与初发菌株枯草芽胞杆菌 AS1.398 产中性蛋白酶的编码基因，测序比较二者基因的不同；在 CPHmodels Server 网站进行氨基酸序列分析，模拟突变前后中性蛋白酶的二级结构。对比结果显示成熟肽中有 5 个氨基酸位点发生突变，其中 3 个位于酶的催化区域内；从预测的二级结构模型上可以看到突变位点所处区域的折叠结构发生细微变化。先前研究中发现枯草芽胞杆菌 AS1.398 和突变株 ZC-7 发酵液中的酶蛋白含量基本相同，因此推测高产的原因不是酶量的增加，而是突变的氨基酸使酶与底物结合的部位更加适合催化水解反应，从而提高其比活力（王建玲等，2009）。从魔芋的内生菌中筛选到能抑制魔芋软腐病病原菌生长、产芽胞的杆状细菌，16S rDNA 序列分析表明该菌是一株枯草芽胞杆菌，命名为 BSn5。BSn5 的胞外蛋白提取液有抗菌活性，并具有对热不稳定、对蛋白酶 K 敏感、对胰蛋白酶不敏感的特性，SDS-PAGE 检测显示该蛋白质提取液仅由分子质量为 31.6kDa 的蛋白质组成。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化该蛋白质，纯化的蛋白质能够抑制软腐病病原菌的生长，进一步表明该 31.6kDa 蛋白质即为该菌的抗菌活性物质。该蛋白质与目前所知的枯草芽胞杆菌产生的抗菌物质均不同，可能是一种新的抗菌蛋白（周盈等，2007）。为了解细胞壁缺陷对枯草芽胞杆菌酸溶性小分子芽胞蛋白（SASP）代谢及芽胞形成的影响。用头孢唑林诱导枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）成为 L 型并传代培养获得稳定 L 型纯培养物，通过生物化学及常规细菌学方法检测 SASP 的合成及芽胞形成情况。在枯草芽胞杆菌稳定 L 型未检测到 SASP，也未能发现典型形态的芽胞。因此细胞壁缺陷可导致枯草芽胞杆菌不能合成 SASP 和产生芽胞（王涛和王和，2008）。魔芋软腐病是一种由胡萝卜软腐欧文氏菌引起的病害，严重影响了魔芋产业的发展。枯草芽胞杆菌 BSn5 所产生的蛋白 APn5 对胡萝卜欧文氏菌具有良好的抑菌效果，将对该蛋白进行鉴定和性质分析。用饱和度为 30%的硫酸铵沉淀和超滤离心的方法从枯草芽胞杆菌 BSn5 的发酵液中提取纯化 APn5 蛋白，以滤纸片

法检测 APn5 蛋白的抑菌谱。用不同的温度、pH 条件和蛋白酶处理 APn5 蛋白，并检测其抑菌活性变化。测定菌株 BSn5 的生长周期，同步检测其发酵上清液的抑菌活性。利用基质协助激光解吸附离子化-飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）和电喷雾四极杆飞行时间串联质谱（Q-TOF）分析 APn5 蛋白。APn5 蛋白对魔芋软腐病病菌具有较好的抑菌活性，抑菌谱较窄，主要对细菌性植物病原菌具有较强的抑制作用；对高温敏感，对蛋白酶 E 敏感，对蛋白酶 K 和胰蛋白酶部分敏感；在酸性环境下其抑菌活性稳定，碱性环境下活性不稳定。在菌株 BSn5 的生长周期中，该蛋白质的抑菌活性不能稳定存在，其发酵上清液在对数生长期抑菌活性逐渐升高，进入稳定期后抑菌活性开始下降，直至完全消失。质谱分析未发现其与已知蛋白质具有高度相关性。APn5 蛋白具有不同于已报道的枯草芽胞杆菌所产生的抑菌物质的性质，推测其为一种新型的抑菌蛋白（韩冬梅等，2008）。通过形态观察和 16S rDNA 序列同源性比较，将一株产耐高温碱性蛋白酶菌株 GXD9901 初步鉴定为枯草芽胞杆菌，对菌株 GXD9901 产蛋白酶的培养条件进行分析表明，最佳产酶培养基为：麦芽糖 3%、$NH_4H_2PO_4$ 0.3%、KCl 0.05%、$Fe_2(SO_4)_3$ 0.001%、K_2HPO_4 0.1%、pH11.2，在 37℃培养 60h 后，蛋白酶活性达 5465U/ml 发酵液（武波等，2001）。采用常规微生物学方法从新鲜鸡粪中分离得到一抑菌效果较好的菌株 BX-6。结合菌落形态特征、生理生化特性及菌株特异性序列分析等手段，确定其分类归属，并采用管碟法对所产细菌素的抑菌特性进行了检测。结果表明，菌株 BX-6 为枯草芽胞杆菌。菌株在发酵过程中产生一定量的 H_2O_2 类抑菌物质，其所产细菌素具有较好的热稳定性、pH 耐受性，对大部分蛋白酶敏感，对鸡白痢沙门氏菌 C79-13、鸡大肠杆菌 01 和金黄色葡萄球菌 C56011 有较好的抑菌效果，具有作为畜禽饲料添加剂的潜力（辛国芹等，2012）。以枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）KD-N2 为发酵菌种，分别以羽毛、人发为碳源和氮源，研究了 5L 发酵罐内角蛋白酶的发酵动力学。根据 Logistic 方程和 Luedeking-Piret 方程建立了菌体生长和产物生成动力学模型。根据实验数据确定了模型参数，以羽毛为唯一碳源和氮源，发酵过程中菌体生长动力学模型为 $dX/dt=0.1013(1-X/0.3742)X$，角蛋白酶生成动力学模型为 $dP/dt=276.69dX/dt-3.6X$，以人发为碳源、氮源底物，发酵过程中菌体生长动力学模型为 $dX/dt=0.0728(1-X/0.197)X$，角蛋白酶生成动力学模型为 $dP/dt=422.34dX/dt+5.187X$（蔡成岗等，2009）。

二、产蛋白酶芽胞杆菌生长曲线

芽胞杆菌的生长阶段与产酶特性紧密相关，不同生长阶段芽胞杆菌产蛋白酶的特性差异很大，一方面是由于芽胞杆菌生长量的关系，另一方面是芽胞杆菌产蛋白酶是在一定的生长阶段的关系。了解芽胞杆菌生长曲线，对于研究其产蛋白酶的阶段和特性具有重要意义。研究以芽胞杆菌 FJAT-14260[沙福芽胞杆菌（*B. safensis*）]为例，进行生长曲线测定，实验结果的 OD_{680} 值、累积 OD_{680} 值、活菌数、累积活菌数见表 2-30。

1）分光光度法。从芽胞杆菌 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）生长曲线整体上看，随着时间的进程，菌株 OD_{680} 值逐步上升，在 32h 达最高峰，随后略有下降，在 50h 前基本达稳定，50h 后，菌株 OD_{680} 值开始急速下降（图 2-26）。通过对菌株 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）芽胞杆菌生长曲线测定，可以看出芽胞杆菌具有适应能力强、生长繁殖快

的特点，0～16h 进入适应期，16～32h 进入对数生长期，32～52h 进入稳定期，52h 以后进入衰亡期。芽胞杆菌 FJAT-14260 OD_{680} 值与时间呈抛物线关系，方程为 $y = -0.0685x^2 + 1.294x-1.8074$，$R^2 = 0.8242$ （y 为累积 OD_{680} 值，x 为生长时间）（图 2-26）。芽胞杆菌 FJAT-14260 累积 OD_{680} 值与时间呈线性关系，方程为 $y = 0.7933x- 4.1942$，$R^2 = 0.981$（y 为累积 OD_{680} 值，x 为生长时间）（图 2-27）。

表 2-30　沙福芽胞杆菌（*B. safensis* FJAT-14260）OD 值与活菌数

时间/h	OD_{680} 值	累积 OD_{680} 值	活菌数/（$\times10^6$ CFU）	累积活菌数/（$\times10^6$ CFU）
0	0.06	0.06	7.3	7.3
4	0.63	0.69	18.5	25.8
8	1.57	2.26	60.5	86.3
12	2.10	4.36	11.9	98.2
16	0.99	5.35	33.0	131.2
20	3.25	8.60	223.0	354.2
24	4.14	12.74	1945.0	2299.2
28	4.58	17.32	47.5	2346.7
32	4.95	22.27	2215.0	4561.7
40	4.54	26.81	2920.0	7481.7
44	4.24	31.05	212.0	7693.7
48	4.36	35.41	875.0	8568.7
52	3.67	39.08	535.0	9103.7
56	1.92	40.00	625.0	9728.7

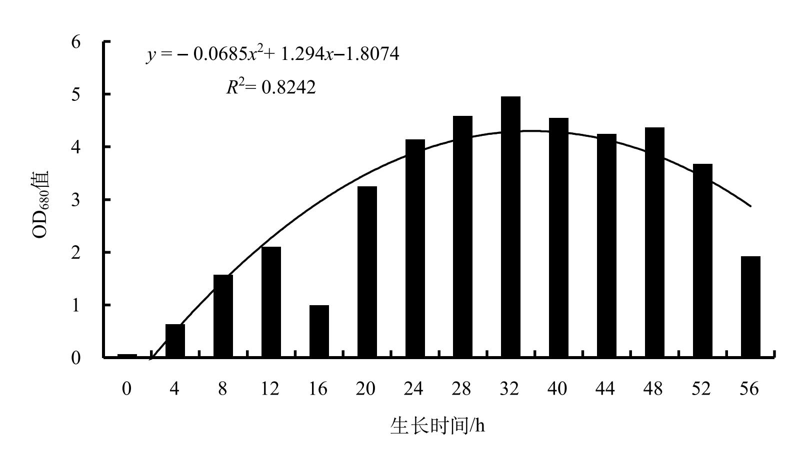


图 2-26　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 OD 值生长曲线

2）活菌计数法。FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）生长特点为：首先 0～16h 进入适应期，16～24h 进入对数生长期，稳定期非常短，24～28h 进入衰亡期，完成第一个生长周期；然后 28～40h 进入第二个对数期，菌体迅速增加，稳定期短，40～44h 进入衰亡期；

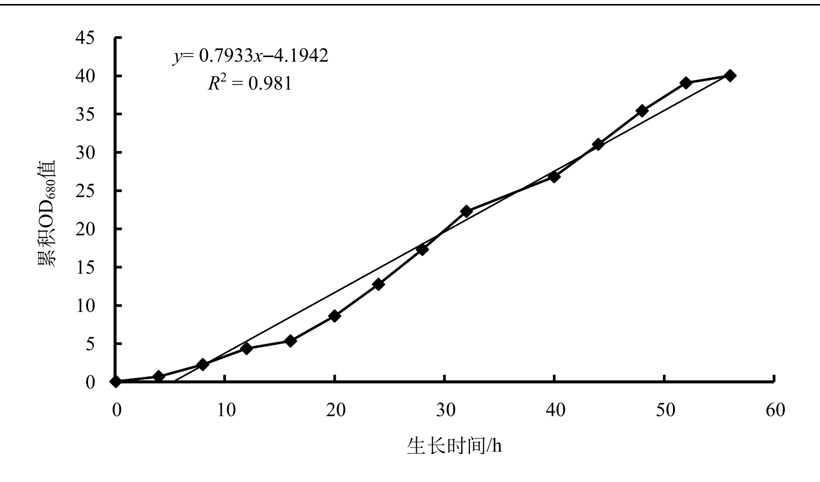


图 2-27　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 累积 OD 值生长曲线

最后 44～56h 完成第三个生长周期。第一个生长周期 28h，活菌数峰值较高，第二个生长周期 16h，活菌数峰值最高，第三个生长周期 12h，活菌数峰值很低。从整体来看，活菌数与时间呈多项式曲线关系，方程为 $y = 3\times10^{-6}x^6-0.0002x^5-0.0098x^4+0.8397x^3-14.093x^2+66.334x$，$R^2$=0.5212（$y$ 为累积 OD_{680} 值，x 为生长时间）（图 2-28）。

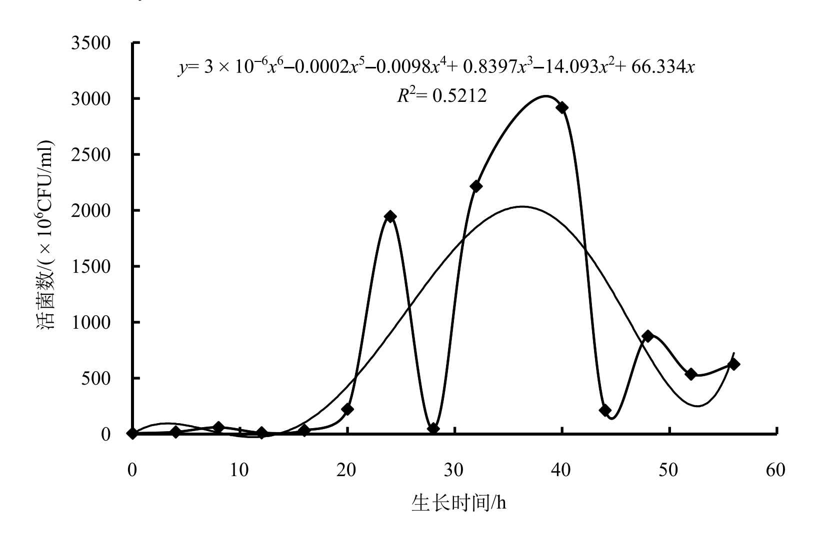


图 2-28　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 的活菌数生长曲线

沙福芽胞杆菌菌株 FJAT-14260 的活菌数统计累积值见图 2-29，从图 2-29 可以看出，沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 累积活菌数随着时间进程而增加，累积活菌数与时间呈幂指数关系，方程为 $y = 3.0897x^{3.1117}$，$R^2 = 0.9391$（y 为累积活菌数，x 为生长时间）。

3）OD_{680} 值与活菌数相关性。沙福芽胞杆菌菌株 FJAT-14260 生长的 OD_{680} 值与活菌数存在着指数关系，在菌株生长初期，OD_{680} 值小于 3 时，其与活菌数呈线性关系，进入生长中后期，OD_{680} 值与活菌数呈指数关系，方程为 $y = 6e^{1.1027x}$，$R^2 = 0.5642$，这种关系存在着较大的误差，方程相关系数仅为 0.5642（图 2-30）。

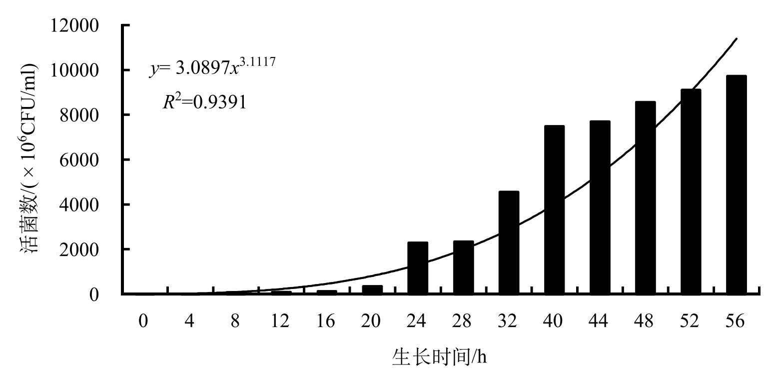


图 2-29　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 的活菌数累积值生长曲线

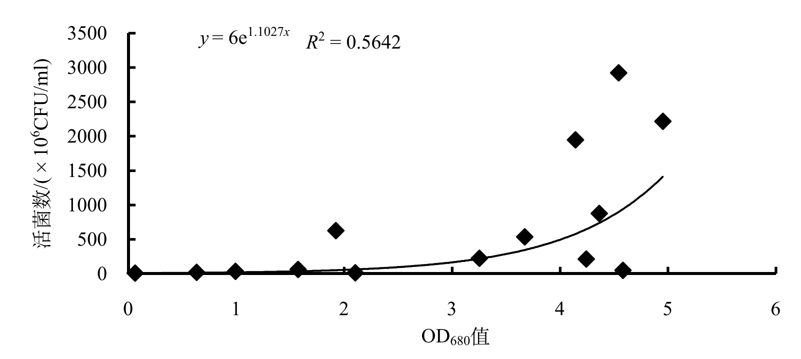


图 2-30　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 的 OD 值与活菌数相互关系

沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 生长的累积 OD_{680} 值与累积活菌数存在着线性关系，当累积 OD_{680} 值小于 10 时，累积活菌数的生长也比较缓慢。累积 OD_{680} 值为 10～40，累积活菌数呈直线增长。其方程为 $y = 262.29x - 859.74$，$R^2 = 0.9671$（图 2-31）。

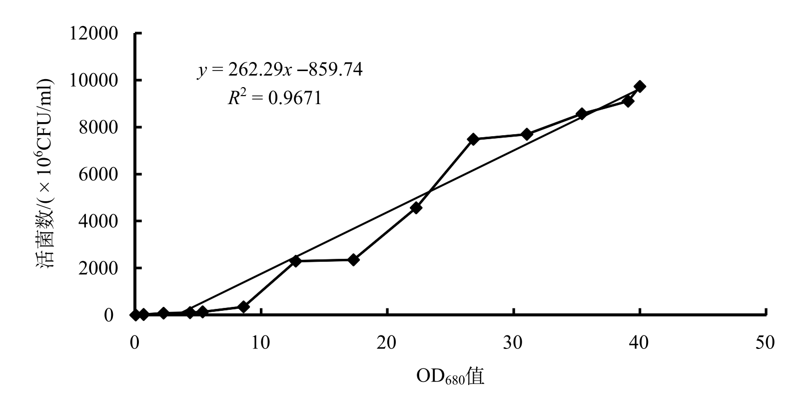


图 2-31　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 的累计 OD 值与累积活菌数相互关系

OD_{680} 值通过浊度换算成菌体浓度，它受到死亡菌体的影响，检测的数值包括了死亡的菌体。活菌数是通过培养计数统计菌体数量，它不受死亡菌体的影响，检测的数值扣除了生长不了的菌体，比较接近实际，同时可以检测出菌株的生长周期。统计 OD_{680} 值的累积值和活菌数的累积值，可以看到 OD_{680} 值的累积值和活菌数的累积值呈密切的

线性关系，该方法可以用于建立 OD_{680} 值与活菌数的数学方程，确定两者相关性，预测已知一个因素统计另一个因素。

三、芽胞杆菌产蛋白酶动态

以芽胞杆菌 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）为例，菌株蛋白酶活性测定结果见表 2-31，产酶曲线见图 2-32。结果表明芽胞杆菌 FJAT-14260 在 24h，酶活很低，酶活值在 106.59U/ml 以下，24h 以后，酶活迅速增加，到 28h 达最高值，酶活峰值达 1022.33U/ml，32h 后，酶活迅速下降到 545.65U/ml，并稳定在 400～500U/ml 的水平，维持到 72h 培养结束。从曲线变化可知，芽胞杆菌 FJAT-14260 蛋白酶活在 28～32h 时最高，所以，此时测定芽胞杆菌 FJAT-14260 酶活最好。

表 2-31　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 蛋白酶活性测定

时间/h	OD 值	L-酪氨酸/（mg/ml）	酶活性（U/ml）
8	0.0169	0.4488	44.88
12	0.0247	0.6686	66.86
16	0.0236	0.6376	63.76
20	0.0303	0.8264	82.64
24	0.0388	1.0659	106.59
28	0.1455	10.2233	1022.33
32	0.1946	5.4565	545.65
40	0.1917	5.3748	537.48
44	0.1949	5.4650	546.50
48	0.1914	5.3664	536.64
52	0.1649	4.6196	461.96
56	0.1611	4.5125	451.25
72	0.1435	4.0165	401.65

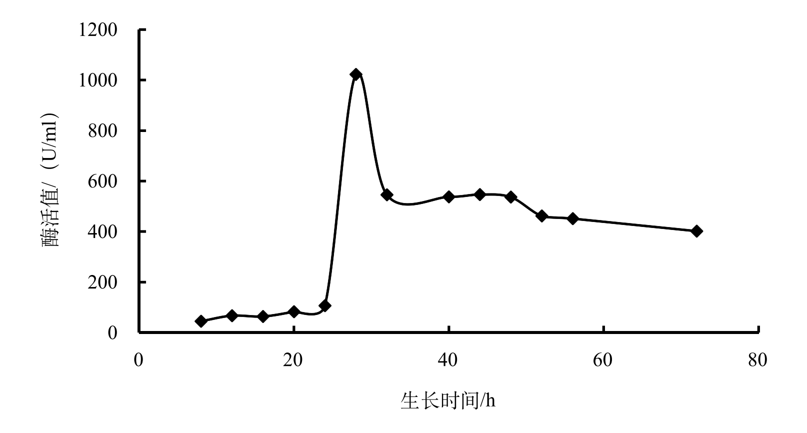


图 2-32　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 蛋白酶酶活性值曲线

四、营养条件对芽胞杆菌产蛋白酶的影响

以蛋白酶液体发酵培养基为基础培养基，首先改变碳源种类，原浓度不变，按表2-32中改变5个不同碳源因子分别接种，摇瓶培养36h，分别测定酶活；然后在最优碳源的基础上，按表2-32中改变5个不同氮源因子分别接种，摇瓶培养36h，分别测定酶活；最后根据以上最优培养基成分，按表2-32中改变5个不同碳氮比因子分别接种，摇瓶培养36h，分别测定酶活。以芽胞杆菌FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）为例进行实验。

表2-32　碳、氮源种类及碳氮比

项目	A	B	C	D	E
碳源	麦芽糖	蔗糖	葡萄糖	玉米淀粉	酵母粉
氮源	蛋白胨	$(NH_4)_2SO_4$	牛肉膏	豆粕	NH_4NO_3
碳氮比	1∶1	1∶2	1∶3	2∶1	3∶1

不同碳源对*B. safensis* FJAT-14260产蛋白酶的影响见图2-33。以酵母粉、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖为碳源时蛋白酶酶活分别为26.70U/ml、38.58U/ml、2.11U/ml、12.73U/ml、1.94U/ml。表明在复合碳源的情况下，*B. safensis* FJAT-14260产蛋白酶能力高，单一碳源情况下，产蛋白酶的能力低。最优碳源为10g/L可溶性淀粉时，酶活最高为38.58U/ml。

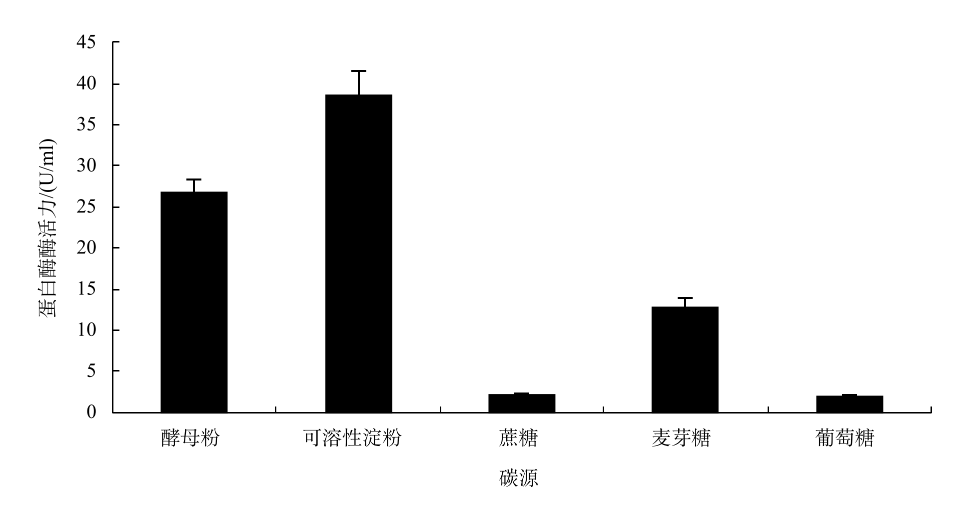


图2-33　不同碳源对沙福芽胞杆菌FJAT-14260产蛋白酶的影响

在碳源优化的基础上，采用类似的方法来探究最优氮源的结果见图2-34。氮源种类对于*B. safensis* FJAT-14260产蛋白酶的影响不明显，根据数值可以确定5g/L豆粕是最优氮源，酶活为48.53U/ml。

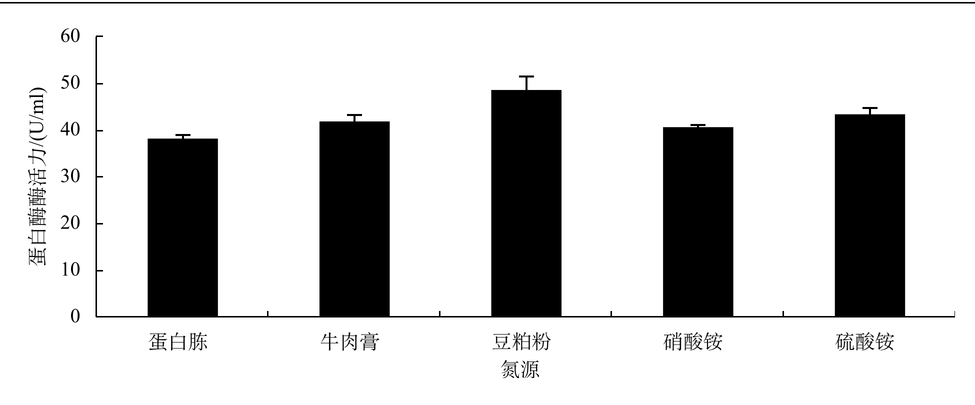


图 2-34　不同氮源对沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 产蛋白酶的影响

以芽胞杆菌 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）为例，在优化的基础上，不同碳氮比对 *B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶活性的影响结果见图 2-35。碳氮比为 1∶3 时，*B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶的能力最低为 32.34U/ml，碳氮比为 3∶1 时，*B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶的能力最高为 53.67U/ml。

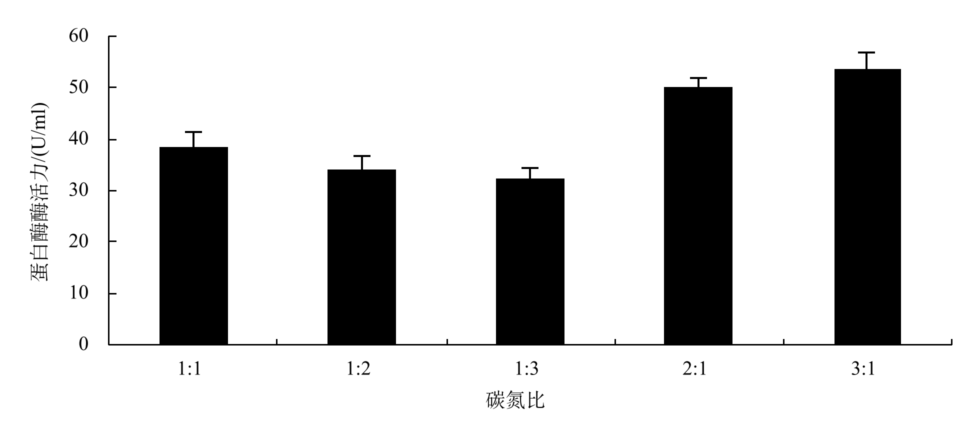


图 2-35　不同碳氮比对沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 产蛋白酶的影响

五、发酵条件对芽胞杆菌产蛋白酶的影响

在以上最优营养成分的基础上，研究培养条件对 *B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶活性的影响。接种摇瓶按表 2-33 培养条件培养：首先研究最适培养温度，按表 2-33 中 5 个不同温度，摇瓶培养 36h，分别测定酶活；然后基于以上最适温度的条件下，研究最适转速，按表 2-33 中所示放在 5 个不同转速中，摇瓶培养 36h，分别测定酶活。最后基于以上研究结果，以 pH 为唯一变量，按表 2-33 中不同 pH 分别接种，摇瓶培养 36h，分别测定酶活。根据以上方法研究单因素改变时产酶的最适培养温度、最适转速及最适 pH。以芽胞杆菌 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）为例进行实验。

表 2-33　不同培养条件水平表

项目	A	B	C	D	E
培养温度/℃	28	30	35	37	40
转速/（r/min）	130	150	170	190	210
pH	5	6	7	8	9

在以上优化条件的基础上，改变培养温度对 *B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶活性的影响，结果见图 2-36。培养温度为 25～35℃时蛋白酶酶活性逐渐升高，培养温度为 35～40℃时蛋白酶酶活性逐渐降低，所以最适培养温度为 35℃，酶活为 56.73U/ml。

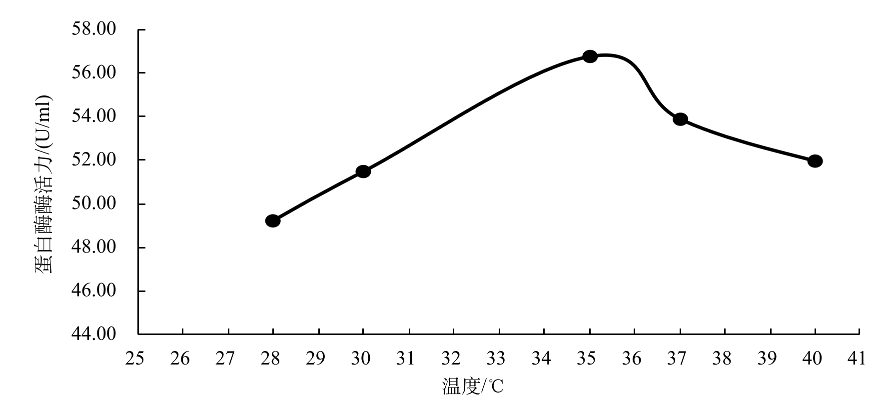


图 2-36　不同温度对沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 产蛋白酶的影响

用不同转速代表通气量，在以上优化的基础上，不同转速对 *B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶活性的影响，结果见图 2-37。转速对蛋白酶活性影响较大，转速为 130r/min 时蛋白酶的酶活性最低，为 37.77U/ml；转速为 190r/min 时蛋白酶酶活性最高，为 60.20U/ml。

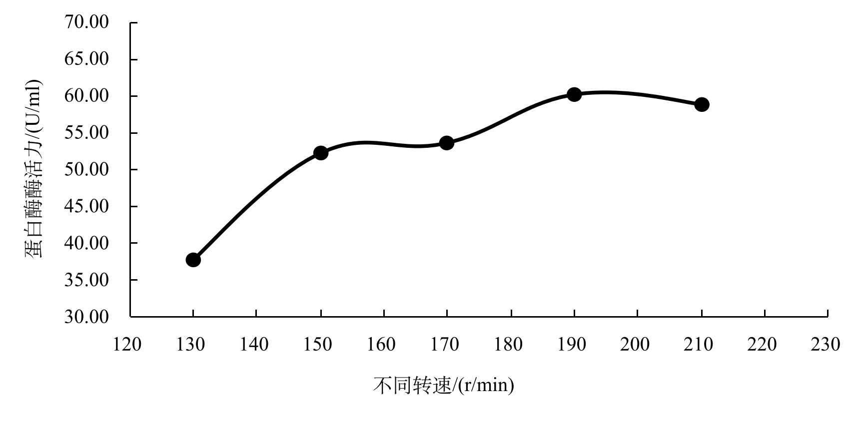


图 2-37　不同转速对沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 产蛋白酶的影响

基于以上优化条件，研究初始 pH 对 *B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶活性的影响，结果见图 2-38。在初始 pH 为 5～8 时蛋白酶活性逐渐增大；初始 pH 为 8～9 时蛋白酶活性开始降低；pH 为 5 时蛋白酶活性最低，为 54.72U/ml；pH 为 8 时蛋白酶活性最高，为 65.02U/ml；酶活高低差距不大，说明 pH 对 *B. safensis* FJAT-14260 产蛋白酶活性的影响不明显。

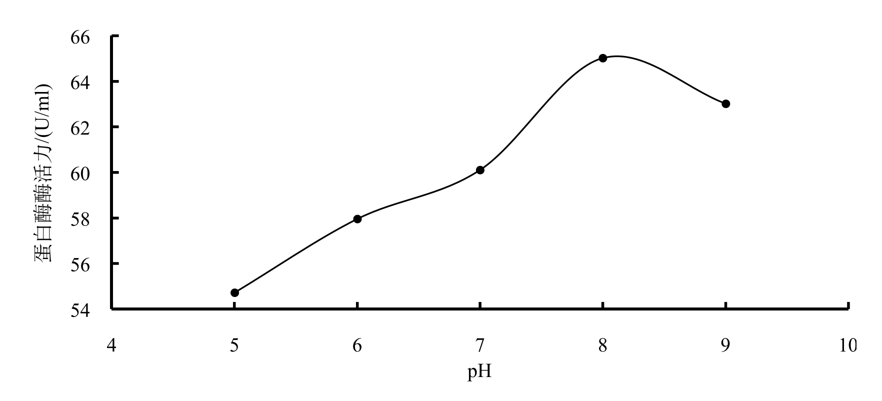


图 2-38　不同 pH 对沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 产蛋白酶的影响

六、发酵时间对芽胞杆菌产蛋白酶的影响

基于优化后的发酵条件，以 2%的接种量接种进行发酵，每 8h 取样一次，8h、16h、24h、…、72h，共取样 9 次，每个点测 OD_{600} 值和蛋白酶活性，每个数据测 3 次求平均值。以芽胞杆菌 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌）为例，基于以上最优发酵条件，每 8h 取样跟踪 *B. safensis* FJAT-14260 的产酶曲线和菌落数曲线（选择菌落计数来反映生长情况），见图 2-39。在 24h 时菌落数达最高；8～32h 酶活迅速增加，到 32h 达最高为 69.26U/ml，然后逐渐达一个稳定的状态。

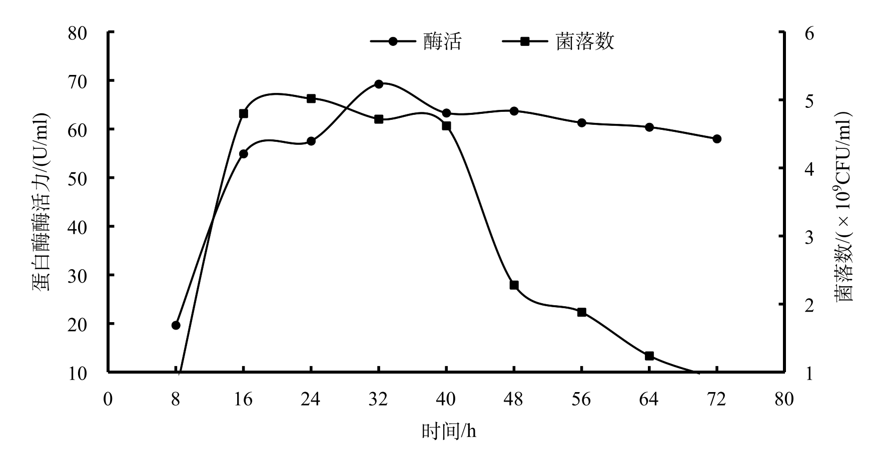
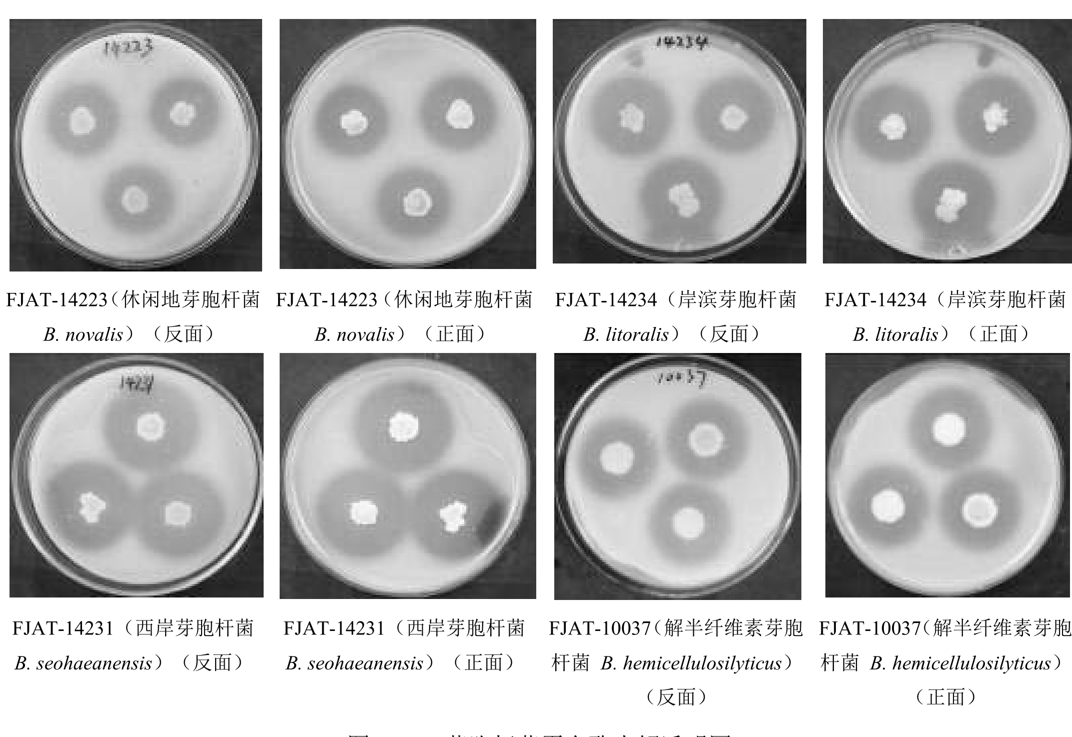


图 2-39　沙福芽胞杆菌 FJAT-14260 不同发酵时间产蛋白酶曲线和生长曲线

七、芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈测定

测定了 120 种芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈，其中 46 个有明显透明圈，其他菌株没有透明圈，实验结果见图 2-40。从图 2-40 中可以看出，有的芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈很大，如休闲地芽胞杆菌 FJAT-14223(*B. novalis*)、岸滨芽胞杆菌 FJAT-14234(*B. litoralis*)、西岸芽胞杆菌 FJAT-14231（*B. seohaeanensis*）、解半纤维素芽胞杆菌 FJAT-10037（*B. hemicellulosilyticus*）等，有的芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈很小，如圆孢芽胞杆菌 FJAT-10036、土壤短芽胞杆菌 FJAT-10018、韩研所芽胞杆菌 FJAT-14240、北京芽胞杆菌 FJAT-14214、马氏芽胞杆菌 FJAT-14248。



FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）（反面）　FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）（正面）　FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）（反面）　FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）（正面）

FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）（反面）　FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）（正面）　FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）（反面）　FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）（正面）

图 2-40　芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈

八、芽胞杆菌产蛋白酶特性分析

蛋白酶水解透明圈和蛋白酶活性都是用来表达芽胞杆菌产蛋白酶特性的指标，前者表现的主要是芽胞杆菌整个生长过程的累积酶活性，后者表现的是特定芽胞杆菌生长期的产酶特性，从不同角度反映芽胞杆菌产蛋白酶特性。研究测定了 120 种的芽胞杆菌，只有 46 种芽胞杆菌测定出蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值和蛋白酶活性，实验结果见表 2-34。从表 2-34 中可知，①不同种类的芽胞杆菌产蛋白酶的能力差异很大；②芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值范围 1.19～6.03，种类间蛋白酶生产能力相差 5 倍；③芽胞杆菌蛋白酶活性范围 4.57～1037.63，种类间蛋白酶生产能力相差 227 倍；④芽胞杆菌种类间的蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值与蛋白酶活性之间无线性相关关系。

九、芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-34 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-41，可以将 46 种芽胞杆菌产蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为 3 类。

表 2-34　芽胞杆菌蛋白酶活性

芽胞杆菌种类	蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值	蛋白酶活性 /（U/ml）
1 FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）	3.62	4.57
2 FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）	3.00	8.23
3 FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）	3.08	39.34
4 FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）	3.55	43.00
5 FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）	1.60	58.56
6 FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）	3.49	59.47
7 FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）	2.16	61.30
8 FJAT-14237（假坚强芽胞杆菌 *B. pseudalcaliphilus*）	2.51	63.13
9 FJAT-14220（阿氏芽胞杆菌 *B. aryabhattai*）	1.76	64.96
10 FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）	3.30	67.71
11 FJAT-14239（加利西亚芽胞杆菌 *B. galliciensis*）	1.19	69.54
12 FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）	1.39	71.37
13 FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）	3.81	75.03
14 FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）	1.63	82.35
15 FJAT-14240（韩研所芽胞杆菌 *B. kribbensis*）	6.03	86.92
16 FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）	1.76	87.84
17 FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）	2.10	90.58
18 FJAT-14214（北京芽胞杆菌 *B. beijingensis*）	2.01	104.31
19 FJAT-14248（马氏芽胞杆菌 *B. macyae*）	3.27	106.14
20 FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）	3.20	121.69
21 FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）	4.24	132.67
22 FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）	3.49	135.42
23 FJAT-14268（嗜硼芽胞杆菌 *B. boroniphilus*）	1.92	135.42
24 FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）	3.08	138.16
25 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）	4.82	142.74
26 FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）	2.66	142.74
27 FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）	3.77	152.80
28 FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）	3.23	185.74
29 FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）	2.24	551.76
30 FJAT-10036（圆孢芽胞杆菌 *B. globisporus*）	1.73	576.46

续表

芽胞杆菌种类	蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值	蛋白酶活性 /（U/ml）
31 FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）	4.16	650.58
32 FJAT-10035（明胶芽胞杆菌 *B. gelatini*）	3.24	667.05
33 FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）	2.62	699.99
34 FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）	2.69	699.99
35 FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）	2.91	724.70
36 FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）	2.72	724.70
37 FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）	3.17	732.93
38 FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）	2.86	757.64
39 FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）	2.80	765.87
40 FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）	3.81	774.11
41 FJAT-10027（砷芽胞杆菌 *B. arsenicus*）	2.09	782.34
42 FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）	2.59	790.58
43 FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）	2.50	798.81
44 FJAT-10020（解葡聚糖类芽胞杆菌 *P. glucanolyticus*）	3.46	831.75
45 FJAT-10007（软骨酸类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）	2.25	864.70
46 FJAT-10011（美丽短芽胞杆菌 *B. formosus*）	4.23	1037.63

注：*H*/*C* 为蛋白酶水解透明圈比值 3 次实验平均值

第 1 类，蛋白酶水解透明圈中等，*H*/*C* 值范围 2.50～4.82，其包含了 31 种芽胞杆菌，即 FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）、FJAT-14237（假坚强芽胞杆菌 *B. pseudalcaliphilus*）、FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）、FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）、FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-10035（明胶芽胞杆菌 *B. gelatini*）、FJAT-14248（马氏芽胞杆菌 *B. macyae*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-10020（解葡聚糖类芽胞杆菌 *P. glucanolyticus*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-10025（高地芽

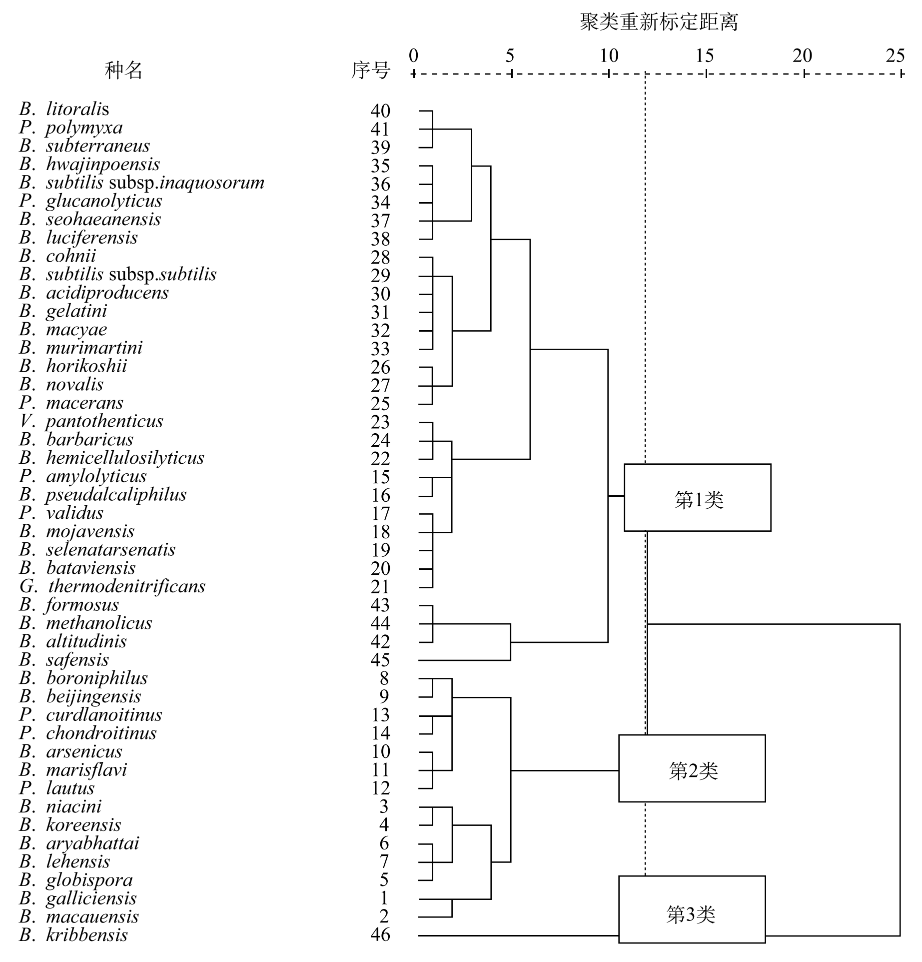


图 2-41　芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-10011（美丽短芽胞杆菌 *B. formosus*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）。

第 2 类，蛋白酶水解透明圈较小，*H*/*C* 值小于 2.4，其包括了 14 个芽胞杆菌，即 FJAT-14239（加利西亚芽胞杆菌 *B. galliciensis*）、FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）、FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）、FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）、FJAT-10036（圆孢芽胞杆菌 *B. globisporus*）、FJAT-14220（阿氏芽胞杆菌 *B. aryabhattai*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14268（嗜硼芽胞杆菌 *B. boroniphilus*）、FJAT-14214（北京芽胞杆菌 *B. beijingensis*）、FJAT-10027（砷芽胞杆菌 *B. arsenicus*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-10007（软骨酸类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）。

第 3 类，蛋白酶水解透明圈较大，*H*/*C* 值大于 6，其包含了一个芽胞杆菌，即 FJAT-14240（韩研所芽胞杆菌 *B. kribbensis*）。

十、芽胞杆菌蛋白酶活性聚类分析

利用表 2-33 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 46 种芽胞杆菌的蛋白酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-42。芽胞杆菌蛋白酶活性可以分为 3 类。

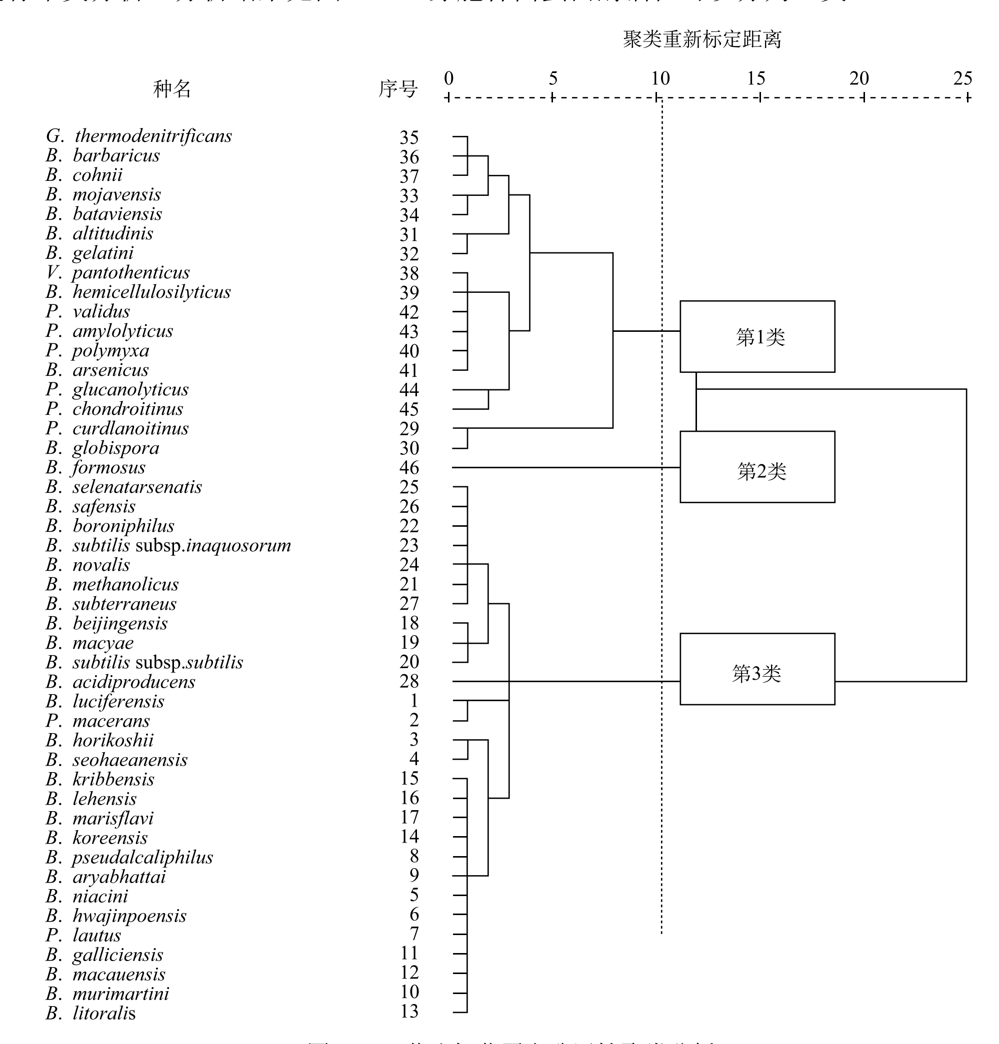


图 2-42　芽胞杆菌蛋白酶活性聚类分析

第 1 类：蛋白酶活性为 551.76～864.70U/ml，其包含了 17 种芽胞杆菌，即 FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-10036（圆孢芽胞杆菌 *B. globisporus*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-10035（明胶芽胞杆菌 *B. gelatini*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）、FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-10027（砷

芽胞杆菌 *B. arsenicus*）、FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）、FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）、FJAT-10020（解葡聚糖类芽胞杆菌 *P. glucanolyticus*）、FJAT-10007（软骨酸类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）。

第 2 类：蛋白酶活性大于 1037U/ml，其包含了一种芽胞杆菌，即 FJAT-10011（美丽短芽胞杆菌 *B. formosus*）。

第 3 类：蛋白酶活性小于 185.74U/ml，其包含了 28 种芽胞杆菌，即 FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-14237（假坚强芽胞杆菌 *B. pseudalcaliphilus*）、FJAT-14220（阿氏芽胞杆菌 *B. aryabhattai*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-14239（加利西亚芽胞杆菌 *B. galliciensis*）、FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）、FJAT-14240（韩研所芽胞杆菌 *B. kribbensis*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14214（北京芽胞杆菌 *B. beijingensis*）、FJAT-14248（马氏芽胞杆菌 *B. macyae*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14268（嗜硼芽胞杆菌 *B. boroniphilus*）、FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）。

十一、芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择芽胞杆菌既测定蛋白酶水解透明圈，又测定蛋白酶活性，建立数据矩阵（表 2-34）。芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在着 3 种类型：①芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值大而蛋白酶活性低，如 FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）的 *H*/*C* 值为 3.62，而蛋白酶活性仅为 4.57U/ml；②芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而蛋白酶活性高，如 FJAT-10036 的 *H*/*C* 值 1.73，而蛋白酶活性为 576.46U/ml；③芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值大，同时蛋白酶活性高，如 FJAT-10011（美丽短芽胞杆菌 *B. formosus*）的 *H*/*C* 值为 4.23，蛋白酶活性为 1037.63U/ml；④芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值小，同时蛋白酶活性低，如 FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）*H*/*C* 值为 1.6，而蛋白酶活性仅为 58.56U/ml。芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值和蛋白酶活性是经常不同步的，这与其生物学特性有关，作者检测的时期，也许是芽胞杆菌蛋白酶检测的最好时期，但对于蛋白酶水解透明圈的测定不是最佳时期，同样，培养条件、营养条件、菌株种类等对其都有影响。

以欧氏距离为尺度，用类平均法进行聚类分析，聚类图见图 2-43。聚类结果将基于蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值与蛋白酶活性的芽胞杆菌分为 3 类。

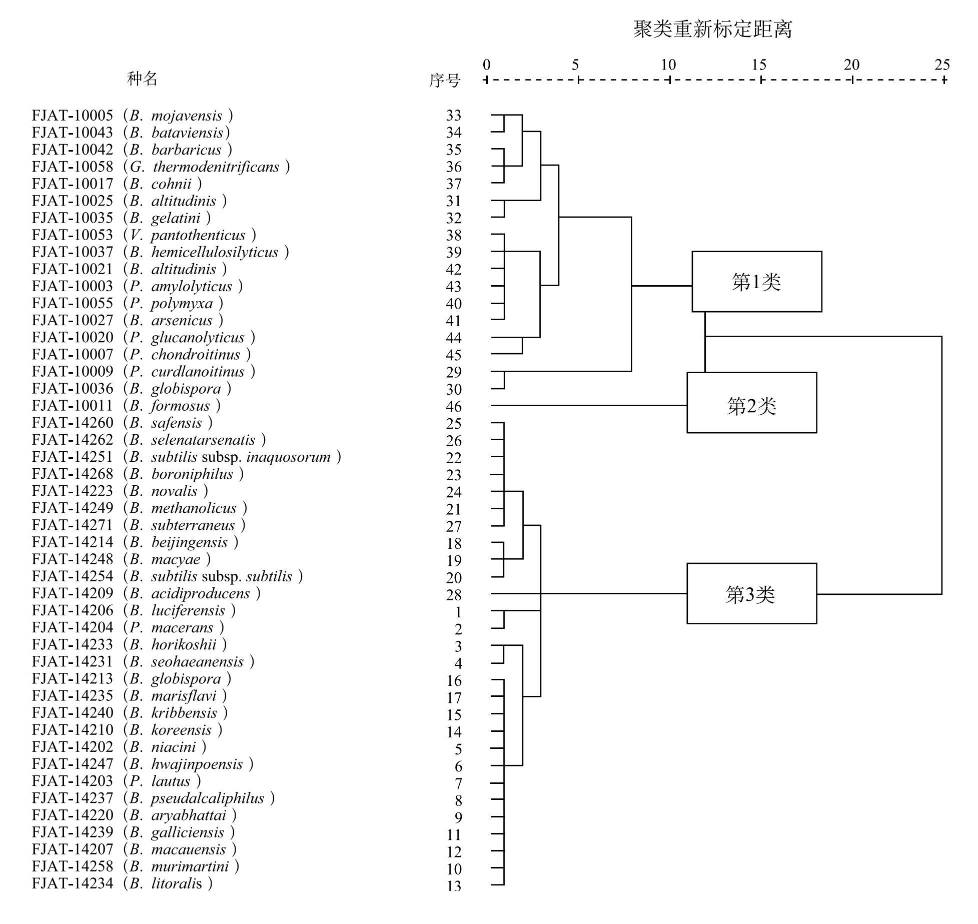


图 2-43　芽胞杆菌蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值与蛋白酶活性的相互关系聚类分析

第 1 类：包括 17 种芽胞杆菌，该类芽胞杆菌蛋白酶活性较高，为 551.76～864.70U/ml，蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化较大，为 1.73～4.16，同时，包括的种类有 FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-10036（圆孢芽胞杆菌 *B. globisporus*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-10035（明胶芽胞杆菌 *B. gelatini*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）、FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-10027（砷芽胞杆菌 *B. arsenicus*）、FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）、FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）、FJAT-10020（解葡聚糖类芽胞杆菌 *P. glucanolyticus*）、FJAT-10007（软骨酸类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）。

第 2 类：该类只有一个芽胞杆菌，即 FJAT-10011（美丽短芽胞杆菌 *B. formosus*），其特点是蛋白酶活性高，为 1037.63U/ml，同时，蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值较大，为 4.23。

第 3 类：其余的 28 种芽胞杆菌，蛋白酶活性为 4.57～185.74U/ml，蛋白酶水解透明

圈 *H*/*C* 值与蛋白酶活性差异较大，*H*/*C* 值为 1.19～6.30，分为两种情况，①蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值较大，蛋白酶活性较小；②蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值较小，蛋白酶活性较大；有 FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-14237（假坚强芽胞杆菌 *B. pseudalcaliphilus*）、FJAT-14220（阿氏芽胞杆菌 *B. aryabhattai*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-14239（加利西亚芽胞杆菌 *B. galliciensis*）、FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）、FJAT-14240（韩研所芽胞杆菌 *B. kribbensis*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14214（北京芽胞杆菌 *B. beijingensis*）、FJAT-14248（马氏芽胞杆菌 *B. macyae*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14268（嗜硼芽胞杆菌 *B. boroniphilus*）、FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）。

第六节　芽胞杆菌产淀粉酶特性

一、概述

芽胞杆菌能很好地利用淀粉，在国内进行过淀粉酶研究的芽胞杆菌种类有 10 种。综述如下。

（1）地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）

地衣芽胞杆菌携带含 α-淀粉酶基因的质粒 pAmy413C，通过原生质体转化导入菌株 HJ01 中，构建成菌株 *B. subtilis* HJ01（pAmy413C）。该菌株连续转接培养 98h，质粒 pAmy413C 保持率为 100%；在 LBS 培养基中，菌株 HJ01（pAmy413C）的 α-淀粉酶活性比原菌株 HJ01 高 3～4 倍；发酵液中葡萄糖含量比菌株 HJ01 高 100 倍以上；以淀粉为碳源，菌株 HJ01（pAmy413C）的核糖产量比菌株 HJ01 提高了 1 倍。结果表明，菌株 *B. subtilis* HJ01（pAmy413C）能够有效地利用淀粉生产核糖（李冬颖和乔建军，2001）。从地衣芽胞杆菌中分离到 α-淀粉酶组分，经 PAGE 及 SDS-PAGE 检测为电泳均一的纯蛋白。该酶最适反应温度为 95℃，50℃和 70℃条件下酶活性稳定，90℃保温 30min，残余酶活性为 28.9%。该酶最适作用 pH 为 6.0～6.5，在 pH5.0～8.0 内稳定。酶的相对分子质量为 65 900，等电点为 6.94，Ca^{2+}、Mn^{2+}、Cu^{2+}、Co^{2+}及 Ba^{2+}对酶具有激活作用，其中 Ca^{2+}的激活作用最显著，且以 4～8mmol/L 浓度为最适。Ca^{2+}还能显著提高酶的热稳定性，4mmol/L Ca^{2+}，90℃保温 30min，酶的残余活力提高至 83%（陈红歌等，2004）。根据

已知 α-淀粉酶编码基因保守区核苷酸序列，通过 PCR 和反向 PCR 技术克隆出 *B. licheniformis* CICIM B0204 α-淀粉酶编码基因 *amyL* 全长序列及其上下游序列。*B. licheniformis* CICIM B0204 *amyL* 由 1539bp 组成，其上游 180bp 为启动子序列，下游 160bp 为终止子序列；成熟肽由 512 个氨基酸残基组成，氨基端的 29 个氨基酸残基为 α-淀粉酶的信号肽。通过基因及其氨基酸序列比对发现，*amyL* 及其编码产物与芽胞杆菌来源的 α-淀粉酶具有高度相似性。将 *amyL* 的结构基因在 PY7 介导下于大肠杆菌中诱导表达，获得具有 α-淀粉酶活性的表达产物。将 *amyL* 的启动子序列和信号肽序列与 *B. lichenifomis* CICIM B2004 的 β-甘露聚糖酶结构基因进行读框内重组，在大肠杆菌中获得了 β-甘露聚糖酶的分泌表达，重组大肠杆菌表达 β-甘露聚糖酶酶活性为 295U/ml（牛丹丹等，2007）。产淀粉酶高温菌在淀粉酶的生产中具有重要意义。从温泉中分离到一株可在 60℃快速生长的淀粉酶产生菌 A12，经 16S rDNA 序列比较和丙酸盐利用等实验将其鉴定为地衣芽胞杆菌。构建了地衣芽胞杆菌 A12 基因文库，并从中克隆到一个 α-淀粉酶基因 *amyA1*，对其进行了测序分析，并在大肠杆菌中实现了表达，为构建一个耐高温淀粉酶生产用工程菌奠定了基础（刘永生等，2003）。采用 PCR 技术扩增 *sacB* 基因的启动子-信号肽序列，并将扩增的序列重组进含地衣芽胞杆菌 α-淀粉酶基因的质粒载体上，构建了含 α-淀粉酶基因的分泌型表达载体 pSA60。将 pSA60 转化枯草芽胞杆菌 QB1098 后，α-淀粉酶基因在 *sacB* 基因启动子-信号肽序列的调控和蔗糖的诱导下获得表达（王红革和罗进贤，1997）。为使地衣芽胞杆菌信号肽序列实现异源基因在大肠杆菌中的分泌表达，将地衣芽胞杆菌中编码耐高温 α-淀粉酶的基因克隆在大肠杆菌表达载体 pET-22b 的 T7 启动子下游，转化大肠杆菌菌株 BL21（DE3）。重组菌株经乳糖诱导后，在上清液中能够检测到淀粉酶活性（蔡恒等，2008）。地衣芽胞杆菌是产生具有重要工业生产价值的耐高温 α-淀粉酶的优良菌株。实验在提取地衣芽胞杆菌完整的基因组 DNA 序列的基础上，通过 PCR 方法克隆了耐高温淀粉酶的结构基因全长 1449bp，与 pUCm-T 载体连接转化入宿主菌 DH5α 中，经过酶切鉴定筛选出阳性的克隆菌，再提取质粒与表达载体 pET-28a（+）酶切后连接转化入宿主菌 DE3 中，其阳性克隆在 37℃、1.0mmol/L IPTG 诱导下，α-淀粉酶的基因得到了较好的表达。表达产物经 SDS-PAGE 鉴定，确定表达的蛋白质大小为 58 000Da 左右，与理论推导的分子质量相一致；并初步对酶及活性，以及酶活最适温度和 pH 进行了研究（潘风光等，2004）。α-Ⅲ是地衣芽胞杆菌变异株 A.4041 高温 α-淀粉酶中的主要组分，每分子含 10 个钙原子，氨基酸分析表明：α-Ⅲ富含丝氨酸（17.9%），天冬氨酸和谷氨酸（包括酰胺）占 20.7%，碱性氨基酸占 7.7%。紫外光谱的最大和最小吸收分别在 278nm 和 249nm，荧光光谱的最大激发波长和发射波长分别为 282nm 和 340nm。远紫外 CD 谱显示 222nm 和 219nm 的双负峰及 208nm 和 216nm 处鼓起的两峰（赵荧和刘宝琦，1998）。以地衣芽胞杆菌高温 α-淀粉酶基因（*amyL*）为报道基因，构建含不同启动子的枯草芽胞芽胞表达载体，转化枯草芽胞杆菌，并对重组菌的酶活进行分析，比较不同启动子对 *amyL* 基因在枯草芽胞杆菌中表达的影响。以高温 α-淀粉酶高产菌株 *B. licheniformis* 0204 染色体 DNA 为模板，PCR 扩增得到 *amyL*，并分别与 PQ 启动子和 P43 启动子进行连接构建表达载体 pUB-PQ-amyL 和 pUB-P43-amyL，化学法转化枯草芽胞杆菌 1A717，筛选得到重组转化子后对重组菌的表达产物进行

SDS-PAGE 和酶活检测。重组菌摇瓶发酵 105h 后测定高温 α-淀粉酶酶活，*B. subtilis*1A717（pUB-PQ-amyL）的最高酶活为 280.1U/ml，*B. subtilis* 1A717（pUB-P43-amyL）的最高酶活为 190.5U/ml。PQ 启动子调控的高温 α-淀粉酶最高表达水平是 P43 启动子调控的最高表达水平的 1.47 倍，说明 PQ 启动子能使 *amyL* 基因在枯草芽胞杆菌中更高效地表达（佟小雪等，2009）。以耐高温 α-淀粉酶生产菌地衣芽胞杆菌染色体 DNA 为模板，通过 PCR 扩增耐高温 α-淀粉酶基因，将扩增产物 1.9kb 的 DNA 片段插入到 PUC19 质粒中，再转化大肠杆菌菌株 JM109，通过在淀粉平板上形成透明圈等方法筛选到一株阳性克隆菌株 JM109，其表达产物可分泌到培养基中，除去菌体酶活可达 27U。将发酵上清液浓缩后用冷无水乙醇分级沉淀，所得样品进行 SDS-PAGE 分析，得到分子质量为 60ku 的目的蛋白质带（李金霞等，2004）。用 PCR 方法从地衣芽胞杆菌中扩增了耐高温 α-淀粉酶基因，将扩增的 DNA 片段插入到大肠杆菌载体 pUC19 中，构建重组分泌型表达载体 pUAM。pUAM 中的耐高温 α-淀粉酶基因在大肠杆菌菌株 JM109 中得到表达。经 SDS-PAGE 分析显示，蛋白质表达产物的分子质量为 55ku，同核酸序列测定所推导的值相符（蔡恒等，2004）。以地衣芽胞杆菌 ATCC14580 基因组 DNA 为模板，PCR 扩增出 1.7kb 大小的麦芽糖淀粉酶基因 *amyM*，克隆入表达载体 pET-28a（+），转化 *Escherichia coli* BL21（DE3），经 IPTG 诱导，测定麦芽糖淀粉酶酶活性。结果表明，麦芽糖淀粉酶基因 *amyM* 获得了活性表达，酶活性为 3.797U/ml，SDS-PAGE 结果显示出相对分子质量约为 67×10^3 的特异性蛋白质条带。酶学性质分析表明，重组麦芽糖淀粉酶的最适反应温度为 45℃，最适反应 pH 为 6.5，在 45℃以下的中低温环境保持稳定，且能在比较宽的 pH 范围内（pH4.5～8.5）稳定（訾楠等，2009）。实验对能在动物肠道产酶的芽胞产品——“益畜宝”的有效成分地衣芽胞杆菌的产酶特性进行了初步定性研究。在单一碳源培养基上的观察结果表明，该地衣芽胞杆菌能产生植酸酶、淀粉酶及蛋白酶。在相同的实验条件下，大肠杆菌和啤酒酵母菌都不产生植酸酶。实验结果还表明，大肠杆菌虽然能产生淀粉酶和蛋白酶，但其活性比地衣芽胞杆菌要低得多，而啤酒酵母菌则不产生淀粉酶和蛋白酶（柏建玲等，2003；孔显良和江洪涛，1993；胡学智和凌晨，1991）。用 PCR、酶切、连接方法将地衣芽胞杆菌耐高温 α-淀粉酶基因（*amy*）表达单元（包括启动子、信号肽及淀粉酶基因）克隆到 pHY300PLK 中，并用反向 PCR、同源重组方法去除重组质粒的氨苄抗性基因，以利用 α-淀粉酶基因的启动子和信号肽高效表达自身蛋白质及外源蛋白质。结果表明：连入了 α-淀粉酶，即 pAMY 质粒能够分泌表达 α-淀粉酶，且去除了氨苄抗性基因的 pAMY 质粒，即 pAMY1 质粒能更有效地表达 α-淀粉酶；将纤维素酶基因连接到 pAMY1 质粒淀粉酶信号肽的下游，得到的重组质粒 pCEL 能分泌表达纤维素酶，表明 α-淀粉酶基因的启动子和信号肽不仅能启动自身蛋白质的表达，也能启动外源蛋白的表达；重组菌的生长情况与质粒拷贝数的比较表明，与 PAMY 质粒相比去除了氨苄抗性基因的 pAMY1 质粒对重组菌的生长没有影响，且 pAMY1 质粒在重组菌的复制效率更高，能更高效地表达蛋白质，以上结果证明 pHY300PLK 克隆质粒已成功改造成表达质粒（覃君君等，2013）。对地衣芽胞杆菌产生的耐高温 α-淀粉酶的生产和特性作一阐述。该酶作用的最适 pH5.5～7.0，最适温度 92℃；酶合成是在对数生长期进行，工业化生产时酶活在稳定期达最高，细胞生长与产酶量成反比；淀粉质原料具有

诱导作用，可避免分解代谢阻遏；蛋白胨、玉米浆是较适宜的氮源；最佳产酶条件 pH6～9，温度 35℃；非酶底物的糖类、多聚物、辛烷等都能增加酶的热稳定性（张礼星，1996）。利用耐高温 α-淀粉酶的生产菌种——地衣芽胞杆菌 IIY-1，对其发酵过程中的各种参数的变化规律与控制方式进行了研究。实验结果表明，采用连续式的 pH 控制方式有利于提高耐高温 α-淀粉酶的发酵水平，最后发酵液的酶活性明显地高于脉动式的 pH 控制方式。菌体在产酶阶段对发酵液的溶氧水平要求不高，但是溶氧浓度（DO 值）不应低于 10%（林剑和郑舒文，2002）。从地衣芽胞杆菌中分离纯化 α-淀粉酶，结合到淀粉、淀粉-硅藻土、淀粉-琼脂糖柱上的 α-淀粉酶可用 2%（*w*/*V*）白糊精快速洗脱。淀粉柱结合 α-淀粉酶的能力为 380μmol/g。纯化后的 α-淀粉酶在 SDS-PAGE 中显示 58kDa 的单一条带。用免疫扩散、免疫电泳确定纯化后酶的特征，并用单向辐射状免疫扩散和 Western 免疫杂交研究了该酶在不同时间的合成情况（Damodara 和陈国泽译，胡又佳校，2006）。从西藏当雄温泉附近的土壤中筛选到一株分泌高温淀粉酶的地衣芽胞杆菌 *B. licheninformis* LT，该菌原始的淀粉酶活为 60U。经优化培养基在 50℃、装液量 10%、180r/min 的摇床培养 72h 后，测得酶活为 105U（蒋若天等，2006）。从西藏当雄温泉附近的土壤中用锥虫蓝平板，55℃培养，筛选到一株分泌高温淀粉酶的菌株，经生理生化初步鉴定，克隆 16S rDNA 基因测序，提交 GenBank 比对后，鉴定为地衣芽胞杆菌，命名为 *B. licheninformis* LT。通过对 *B. licheninformis* LT 的生长条件和产酶条件的研究表明：该菌高温特性良好，最高可以在 65℃生长，产酶最适温度 50℃；可以在 pH3.0～11.0 的 LB 培养基中生长，最佳产酶 pH10.0，LB 培养基加入淀粉诱导，发酵液酶活可达 80U。对该菌所产 α-高温淀粉酶的性质研究表明：酶的最适反应温度为 95℃，100℃处理 60min，最适酶作用 pH10.0，添加 1g/L 的钙离子具有激活作用（蒋若天等，2007）。以兰州市淀粉厂附近的土壤中分离到的地衣芽胞杆菌为初发菌株，经过紫外线诱变及紫外线（UV）+硫酸二乙酯（DES）复合诱变方法，从大量突变株中进行筛选，最终成功地选育出一株高产、稳定、中温的异淀粉酶生产菌株 UV-6-DI，其产酶活性由出发菌的 3.35U/ml 提高到 7.37U/ml，提高了 120%（王弋博等，2003）。

（2）短短芽胞杆菌（*B. brevis*）

应用 PCR 技术从枯草芽胞杆菌 168 中分离出 α-淀粉酶基因。将其引入分泌表达载体 pBKE50 后，用 Tris-PEG 法转入短短芽胞杆菌 50 中，发现 α-淀粉酶以活性形式分泌表达。酶活分析表明 α-淀粉酶活性约为出发菌枯草芽胞杆菌 168 的 1.7 倍（彭清忠和张惟材，2002）。

（3）短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）

为了筛选短小芽胞杆菌强启动子元件，应用 PCR 技术从枯草芽胞杆菌 168 中分离出 α-淀粉酶基因，用其作为报道基因与质粒 pUB110 和 pKF3 一起构建了启动子筛选载体 pKB/A。将短小芽胞杆菌细胞壁蛋白质基因启动子引入该载体构建成重组质粒 pKB/PA，电穿孔法转化短小芽胞杆菌 50 后发现 α-淀粉酶以活性形式分泌表达，结果表明短小芽胞杆菌启动子筛选载体构建成功（彭清忠等，2010；马明和郑宏，1992）。

（4）解淀粉芽胞杆菌（*P. amylolyticus*）

从新疆高海拔地区采集土样中定向筛选得到一株低温淀粉酶产生菌株 LA77，初步

鉴定为解淀粉芽孢杆菌。摇瓶发酵实验表明，该菌株最适产酶温度为 35℃，最佳产酶 pH 为 6.0，生长高峰出现在 30h，产酶高峰出现在 38h，低温淀粉酶的活力达 34.5U/ml，温度超过 40℃时此酶极易失活。此菌株生长周期短，产生的淀粉酶在温度高于 40℃极易失活，在化工和食品等行业有良好的应用前景（王晓红等，2007）。

（5）巨大芽孢杆菌（*B. megatherium*）

以从烟叶表面筛选得到的巨大芽孢杆菌 Bck 为初发菌株，经理化诱变处理，采用透明圈法进行初筛，即在淀粉培养基和蛋白质培养基平板上挑取 *H*/*C* 值（透明圈直径与菌株直径之比）较大的菌株，然后对这些菌株进行摇瓶复筛，测定发酵液 α-淀粉酶和蛋白酶的活性，得到酶活性较高的菌株 B80，其产生的 α-淀粉酶活性是菌株 Bck 的 1.964 倍，蛋白酶活性是菌株 Bck 的 2.266 倍。该菌株能稳定遗传，经 5 代传代培养后，其产生的 α-淀粉酶和蛋白酶活性分别稳定在 2.821～3.273U/ml 和 21.21～27.36U/ml（赵铭钦等，2008；李隽和蒋如璋，1999）。从巨大芽孢杆菌的全基因组 DNA 文库中筛选出一个 β-淀粉酶基因 *amyG*，分析测定了其核苷酸序列并进行了诱导表达；其中 *amyG* 编码的蛋白质有 545 个氨基酸、分子质量为 60.194kDa，与已报道的巨大芽孢杆菌 DSM319 的 β-淀粉酶序列有 94.5%的同源性。经氨基酸序列比较分析发现，*AmyG* 从 N 端到 C 端依次由信号肽域、糖基水解酶催化功能域和淀粉结合域 3 个功能域组成。其中催化功能域里含有第 14 家族糖基水解酶常见的几个高度保守的酶催化活性区。经多步纯化，重组酶的比活共提高了 7.4 倍，获得凝胶电泳均一的蛋白质样品，经 SDS-PAGE 测定，AmyG 酶的分子质量为 57kDa。该酶的最适反应温度为 60℃，最适反应 pH 为 7.0；在温度不超过 60℃时，酶活较稳定；AmyG 能迅速降解淀粉生成麦芽糖，属于外切 β-糖苷酶（吴襟和张树政，2008；吕向阳和蒋如璋，1991）。探讨了双启动子对基于溶源性噬菌体构建的重组枯草芽孢杆菌中外源蛋白质表达的影响。分别将不含或含有本身启动子的 α-淀粉酶基因（来源于 *B. amyloliquefaciens*）和青霉素酰化酶基因（来源于 *B. megatherium*）克隆到溶源性枯草芽孢杆菌中，得到重组菌 *B. subtilis* AMY1、*B. subtilis* AMY2、*B. subtilis* PA1 及 *B.subtilis* PA2。由于同源重组，所克隆的片段整合到溶源性枯草芽孢杆菌中的噬菌体基因组上，并处于噬菌体强启动子的下游。在重组菌 AMY1 和 PA1 中，在热诱导的情况下外源基因的转录只受到噬菌体启动子的作用，而在重组菌 AMY2 和 PA2 中，在热诱导下外源基因的转录同时受到噬菌体启动子和基因本身作用，淀粉酶的表达量提高了 133%，使重组青霉素酰化酶的表达量提高了 113%（刘刚等，2006；杨丽珠和马明，1993）。耐碱性巨大芽孢杆菌 9-A2 经紫外线、甲基磺酸乙酯和硫酸二乙酯等多次诱变处理，获得一株产碱性 α-淀粉酶能力较高的变异株 L-49。菌株 L-49 比初发菌株的产酶能力提高近 2.5 倍，以酵母膏为氮源，以可溶性淀粉为碳源，初始 pH9～10，种龄 18h，接种量 5%（*V*/*V*），30℃培养 48h，酶活性可达 730μ/ml（贾士儒和赵树欣，1995）。

（6）枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）

耐热 α-淀粉酶被广泛用于食品等诸多行业，从我国北方高温堆肥分离的枯草芽孢杆菌 FS321 中克隆了一中度耐热 α-淀粉酶基因，并实现在大肠杆菌菌株 BL21（DE3）中的表达。通过 PCR 技术克隆 *B. subtilis* FS321 的 α-淀粉酶编码基因（*bsa*），该基因全长 1980bp。并构建重组表达质粒 pET-28a/BSA，转化大肠杆菌菌株 BL21（DE3），经 IPTG

诱导表达，SDS-PAGE 检测到大小约为 73.0kDa 的重组融合蛋白，可溶性淀粉平板检测结果表明，BSA 在大肠杆菌中实现了有效表达。该重组 α-淀粉酶的最适反应温度为 50℃，最适反应 pH7.5（施碧红等，2011）。研究低能 N^+注入中温 α-淀粉酶产生菌 BF7658 的诱变方法。经不同注入量的 N^+注入实验后，得出 N^+最佳注入量为 $1\times10^{16}/cm^2$，并筛选获得一株耐酸性 α-淀粉酶产量较高的枯草芽胞杆菌突变株。该突变株所产 α-淀粉酶的酶活可达 207U/ml，遗传稳定性较好（蔡兴旺等，2011）。依次使用质量体积分数为 0.01%、0.03%和 0.05%的秋水仙碱诱变处理枯草芽胞杆菌，结果表明秋水仙碱抑制枯草芽胞杆菌的生长；枯草芽胞杆菌分泌 α-淀粉酶的能力与秋水仙碱的浓度呈正相关。最后分析和探讨不同浓度的秋水仙碱对枯草芽胞杆菌分泌 α-淀粉酶能力的影响及其作用机理（聂光军等，2006）。为提高枯草芽胞杆菌产淀粉酶能力，从养虾池、混养池及污染河流的底质活性污泥中分离到 12 株枯草芽胞杆菌，通过淀粉降解试验筛选到产酶能力较高的菌株 H4 和 H5，菌株淀粉酶活性分别为 38.66U/ml、37.10U/ml。以筛选到的 H4 和 H5 为原始菌株，采用紫外诱变的方法对菌株 H4 和 H5 进行连续诱变，筛选产淀粉酶高的突变株。结果发现，第一次诱变后突变株的酶活分别为原始菌株的 107%和 111%；经过第二次诱变后，H4 的突变株 H4Ⅱa，H5 的突变株 H5Ⅱa 和 H5Ⅱb 的产酶能力有很大程度的提高，分别为原始菌株的 147%、136%和 135%，酶活达 56.95U/ml、50.47U/ml 和 50.02U/ml，说明连续紫外诱变有利于突变株产酶能力的提高（谢凤行等，2009）。对分离得到的菌株 D53、D56 经 PCR 扩增后，测定其 16S rRNA 基因序列，与基因库中基因序列进行同源性比较可知，菌株 D53、D56 与枯草芽胞杆菌的相似性达 99%。结合其形态观察及生理生化实验综合分析，得出两株菌为枯草芽胞杆菌，并在 GenBank 中申请登录号分别为 DQ923482 和 DQ923483。菌株 D56 的产酶能力达 6.5U/ml 和 8.2U/ml（郭凤莲和陈存社，2007）。采用超临界 CO_2 诱变淀粉酶产生菌枯草芽胞杆菌，提高其产淀粉酶的活力。结合平板初筛与发酵培养测定酶活性复筛的方法，考察了诱变条件如诱变压力、诱变温度和诱变时间对诱变该菌的影响。其最佳诱变条件为：压力 8.0MPa、温度 37℃、时间 30min，在此条件下，诱变株的淀粉酶活性提高了约 33%（鄢洪德等，2013）。从牛瘤胃液中筛选出一株性状优良、产蛋白酶和淀粉酶活性较高的菌株，经初步鉴定为枯草芽胞杆菌。结果表明，该菌株产蛋白酶和淀粉酶的最适时间分别在培养的 48h 和 96h，蛋白酶和淀粉酶的最高酶活性分别为 221.57U/ml 和 54.06U/ml，最适温度分别为 40～50℃和 20～50℃，最适 pH 为 6.0～7.0 和 6.0～8.0（王朋朋等，2009）。采用 PCR 技术扩增 *sacB* 基因的启动子-信号序列，并将扩增的序列重组进含地衣芽胞杆菌 α-淀粉酶基因的质粒载体上，构建了含 α-淀粉酶基因的分泌型表达载体 pSA60。将 pSA60 转化枯草芽胞杆菌 QB1098 后，α-淀粉酶基因在 *sacB* 基因启动子-信号序列的调控和蔗糖的诱导下获得表达，表达产物分泌至胞外（王红革和罗进贤，1997）。为了筛选对淀粉降解效果好的淀粉酶产生菌株，从浙江、山东等地富含淀粉的土壤样品中筛选出一株产淀粉酶活性较强的菌株 BSJD10，结合菌落形态、生理生化指标和 16S rDNA 序列分析，对其种群形态和个体形态进行观察和鉴定，确定菌株 BSJD10 为枯草芽胞杆菌（刘杰雄等，2010）。以盾叶薯蓣淀粉为唯一碳源，探讨不同淀粉浓度对一株污染地分离菌（*B. subtilis* HY-02）α-淀粉酶活性的影响。32℃恒温摇床发酵实验表明：淀粉浓度在 1.75%时，枯草芽胞杆菌 α-

淀粉酶活性、细菌数及淀粉消耗量均较 0.5%、1%实验组明显增加。32℃温度下，淀粉浓度与枯草芽胞杆菌 α-淀粉酶活性呈正相关，为选择微生物法解决淀粉导致的水源污染提供了依据（金志雄等，2004；Hayi 和沈天翔，1989）。筛选高淀粉酶、蛋白酶活性的枯草芽胞杆菌，用于研制高效净水微生态制剂。通过对枯草芽胞杆菌液体发酵所产生的淀粉酶、蛋白酶活性的研究，从来源不同的 10 株枯草芽胞杆菌样品中筛选出两株蛋白酶及淀粉酶活性相对较优的菌株 H001、H008，并对这两株菌株的形态、菌落形态、生理生化特征进行鉴定，基本确认所筛选到的菌株均属于芽胞杆菌属，可用于制备高效净水微生态制剂（李力等，2008）。使让一种有抗菌活性的非致病性枯草芽胞杆菌 BS224 表达碱性成纤维细胞生长因子（bFGF），使其同时具有抗菌和促进伤口愈合的作用。用 PCR 方法克隆了一个 α-淀粉酶高产株的 α-淀粉酶基因的启动子和信号肽序列，以及 3′端序列，合成了 gnt（葡萄糖酸盐操纵元）终止子序列作为构建碱性成纤维细胞因子的 cDNA 序列一起插入质粒 pHV32，组建成整合型载体，该质粒来源于大肠杆菌质粒 pBR322 和枯草芽胞杆菌质粒 pC194。然后通过原生质体转化法转化菌株 BS224，氯霉素抗性筛选得到转化体，用 α-淀粉酶分析实验和 Southern 杂交证明其发生了同源重组，Western 杂交证明碱性成纤维细胞因子有表达（吴丹和王艳飞，2002；姜涌明和史永昶，1992；王桂芬和蒋如璋，1989）。对枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* Ki-2-132 的 UV 诱变菌株 HD132 发酵产生的 α-淀粉酶进行了初步研究，结果表明：在实验条件下，枯草芽胞杆菌 HD132 比菌株 BF7658 产生的 α-淀粉酶活性高，α-淀粉酶的最适温度为 60℃，最适 pH 为 6.0，Ca^{2+}对酶有一定的激活作用，而 Cu^{2+}、Fe^{2+}和 Fe^{3+}强烈抑制 α-淀粉酶的活性（李秀凉和周东坡，2008）。采用鸟枪法克隆到枯草芽胞杆菌 α-淀粉酶基因，实验证实，已报道的 α-淀粉酶的基因大小为 2kb 左右，因此回收 3～7kb 的目的片段较适宜，对质粒去磷可防止自连，并能显著提高外源片段的连接效率，采用扩大酶连的方法有助于酶连产物的进一步提高，高效感受态比普通感受态构建基因文库效率要高两个数量级。高效、快捷的鉴定 α-淀粉酶的筛选培养基是克隆 α-淀粉酶基因必不可少的条件（马向东和康海霞，2000）。以枯草芽胞杆菌为实验菌株，采用液态培养基发酵，探讨枯草芽胞杆菌产 α-淀粉酶的最佳发酵条件，分别对碳源、氮源、发酵时间、接种量、培养基初始 pH 进行单因素试验，在此基础上对碳源浓度、氮源浓度、接种量、培养基初始 pH 这 4 个因素进行了 L_9（3^4）正交优化试验。结果表明，葡萄糖、尿素优于其他氮源，最佳培养时间为 30h；最佳发酵参数组合为 pH 5.0，葡萄糖质量浓度 0.2%，尿素质量浓度 1.5%，接种量 2.5%（赵望锋和周晶，2011）。研究浙江建德分离得到的枯草芽胞杆菌 α-淀粉酶的产酶规律和酶学性质。将分离得到的枯草芽胞杆菌发酵培养，研究其 α-淀粉酶产酶规律，并研究了温度、pH、金属离子对酶学性质的影响。利用双倒数曲线法获得该酶的米氏常数 K_m，随着发酵时间的延长，发酵液中 α-淀粉酶的含量提高。在培养 30h 时，产酶量达最高。该 α-淀粉酶的最佳反应温度和 pH 分别为 40℃和 7.5。该酶具有一定的热稳定性，对酸碱条件较敏感。Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}对该酶具有激活作用，Pb^{2+}、Hg^{2+}对该酶具有显著的抑制作用，Cu^{2+}的影响不显著。该淀粉酶的米氏常数 K_m 为 2.31×10^{-3}mol/L，研究对该菌株 α-淀粉酶的开发及工业应用具有较强的指导意义（高永生等，2011）。以实验室保存的枯草芽胞杆菌为初发菌株，利用紫外诱变的方法，获取可高效发酵生产淀粉酶

的突变株。通过筛选及连续传代实验，确定了一株突变性状能稳定遗传的突变株，其淀粉酶产量达 2.264U/ml，比初发菌株提高了 190.63%（马颖辉等，2011）。对枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis* JL-7）产淀粉酶的酶学性质进行了分析，该淀粉酶的最适温度为 65℃，最适 pH 为 6.0，在 pH6.0～8.0 时稳定性较好。该淀粉酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 0.785mg/ml、41.3μmol/（min·ml）。Ca^{2+}、K^+对淀粉酶活性具有显著促进作用（闵越双等，2010）。利用基因工程的手段获得高产中温 α-淀粉酶基因工程菌株 pWB-amy/WB600，对其在 7L 发酵罐中的发酵条件进行了研究和优化。结果表明，发酵过程中通过调节通气量和搅拌转速来控制发酵液中的溶氧含量，使溶氧浓度控制为 15%～25%；采用流加氨水的方式控制发酵液的 pH 为 6.0～7.5（孙静等，2009）。利用基因工程手段获得的产耐酸性高温 α-淀粉酶基因枯草芽胞杆菌工程菌株 pWB-amyd/WB600，通过单因素筛选及正交试验进行发酵培养基优化，得到的最佳配方为：玉米粉 20g/L、蛋白胨 30g/L、$CaCl_2$ 0.5g/L、Na_2HPO_4 8g/L。同时确定最佳培养条件为 pH6.5、200r/min 摇床培养 36h，接种量为 2%，装液量为 30ml/250ml。在此优化条件下，耐酸性高温 α-淀粉酶活性达 3980U/ml，是未优化条件下的 2.1 倍（胡博等，2012；朱卫民和吴宁一，1992）。对分离得到的两个菌株（BH 和 BM）进行鉴定，并对它们在芽胞杆菌培养基和淀粉富集培养基上的形态进行观察，通过对其 16S rDNA 序列的分析，构建系统进化树，确定 BH 为枯草芽胞杆菌，BM 为解淀粉芽胞杆菌。根据已报道的枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌淀粉酶基因保守区域设计引物，采用 PCR 扩增的方法成功获得两个淀粉酶基因，其编码区的长度分别为 1434bp 和 1563bp，为该菌株的进一步利用开发提供了数据支持（胡苗清等，2011）。构建了高效表达耐高温 α-淀粉酶的枯草芽胞杆菌表达系统，并研究了该表达系统的主要特点，通过 PCR 扩增地衣芽胞杆菌的基因组 DNA，分离获得高温淀粉酶基因后，将其克隆到质粒 pSG703 中，然后用质粒 pSG703 转化含温和性噬菌体 φ105MU331 的枯草芽胞杆菌，通过同源重组使高温淀粉酶基因插入，由于高温淀粉酶基因处于噬菌体的强启动子下游，在热诱导后可以实现高温淀粉酶的高效表达，诱导后 8h 内分泌到培养液中的高温淀粉酶活性可以达 9.58×10^3U/ml，构建的重组高温淀粉酶表达系统稳定（刘刚等，2005）。选育出耐热 α-淀粉酶产生菌枯草芽胞杆菌抗噬菌体菌株，从耐热 α-淀粉酶产生菌枯草芽胞杆菌 HA06 的异常发酵液中分离到两种噬菌体，将其命名为 KB011、KB012。以枯草芽胞杆菌 HA06 为初发菌株，采用噬菌体、紫外线和 MNNG 复合诱变法选育具有抗性的高产突变株，并对突变株的遗传稳定性和发酵的酶活性进行了考察。获得了 3 株抗性株，将其命名为 KSB04、KSB08、KSB14，它们在试验浓度下对噬菌体 KB011、KB012 具有明显的抗性，在整个培养过程中表现正常。而敏感菌株 HA06 的生长则受到明显抑制，并产生大量的噬菌体，培养液中噬菌体的浓度最高可达 10^2CFU/ml 以上。抗性株 KSB04 和 KSB14 有较好的遗传稳定性，在 7 次传代后酶活性仍在 3500U/ml 以上。获得了遗传稳定且发酵性能与出发菌相似的两株抗性株 KSB04 和 KSB14（张建宁，2009）。从土壤中筛选到一株产酸性 α-淀粉酶的野生菌株 N7，此菌株具有较高的产酶活性。通过菌落形态、菌体特征观察和 16S rDNA 序列比对，鉴定该菌株为枯草芽胞杆菌。其酶学性质研究表明，菌株代谢产酶的反应最适温度为 53℃，最适作用 pH 为 4.6，在 pH3.0～10.0 时，具有较好的酸稳定（秦艳等，2009）。研究可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖 3 种主要碳

源对枯草芽胞杆菌产 α-淀粉酶活性、细菌浊度及其发酵培养过程中培养基 pH 变化的影响。结果表明，枯草芽胞杆菌在摇床发酵试验中，当发酵时间超过 54h 时，酶活性基本达最高且保持不变。以可溶性淀粉为碳源时最佳，枯草芽胞杆菌产 α-淀粉酶酶活提高，细胞浊度为 2.342±0.023；其次是葡萄糖和蔗糖，最高酶活分别为（75.6±2.1）U/ml 和（72.2±1.2）U/ml，细胞浊度分别为 2.515±0.031 和 2.421±0.044。可见枯草芽胞杆菌产生 α-淀粉酶受淀粉的诱导，受蔗糖及葡萄糖的阻遏作用（李刚等，2010；刘士清和张无敌，1998）。枯草芽胞杆菌可以产低温淀粉酶，为了提高低温淀粉酶的酶活性，采用响应面法优化枯草芽胞杆菌发酵产低温淀粉酶的工艺条件。在单因素试验的基础上，确定对酶活性影响较大的 3 个因素，即最适温度、最适 pH、金属离子。以酶活性为响应值，进行响应面法优化，并验证优化方案。实验结果表明，低温淀粉酶酶活的优化参数为：最适反应温度为 30℃，最适 pH 为 6.0，对酶活性激活作用最强的金属离子为 Ca^{2+}，浓度为 0.01mol/L，在此条件下，低温淀粉酶活性为 32.67U/ml，与模型拟合度高（库米拉 · 马吉提等，2012）。用荧光光谱、紫外差示光谱和 CD 谱研究了一些理化因子对枯草芽胞杆菌 86315 α-淀粉酶的构象与活力的影响。实验表明，酸变性和碱变性所引起的酶构象变化是不同的；乙醇不降低 α-淀粉酶活性，但使其构象发生较大变化，α 螺旋度从天然酶的 26.1%降到 21.8%，其构象变化不引起活性中心的改变；酶在 70℃处理 10min 后，由原来紧密构象变为松散构象，α 螺旋度从 26.1%降到 9.0%，酶活性完全丧失（史永昶和姜涌明，1995）。用平板水解圈法从土壤中分离产淀粉酶菌株，通过碘比色法测定产淀粉酶菌株的酶活，筛选出一株产酶量较高的菌株，鉴定其种类，并对其产酶条件优化及酶学性质进行研究。通过革兰氏染色、生化鉴定和 16Sr DNA 序列比对鉴定该菌的种类；从 pH、温度、碳源、氮源等方面进行产酶条件优化。通过 16S rDNA PCR 序列分析比对，为枯草芽胞杆菌，因此将分离到的菌株命名为 *B. subtilis* Y9；菌株最佳培养基配方为淀粉 6g、酵母膏 13g、氯化钠 5g，添加 1.0%的吐温于 1000ml 蒸馏水中；最佳培养条件为初始 pH 为 7.5，培养温度为 37℃，培养时间 36h。在上述培养基和优化培养条件下，菌株发酵液的 α-淀粉酶酶活达 7.1U/ml，约为初发菌种的 5.5 倍。酶学研究显示，α-淀粉酶的最适反应温度为 40～60℃，反应体系 pH 为 6.6，并需添加 0.5% $CaCl_2$（阙祖俊等，2010）。对实验室保存的一株产 α-淀粉酶的枯草芽胞杆菌的 16S rDNA 区进行克隆及序列分析。采用 PCR 克隆方法，对其菌株的 16S rDNA 区进行序列扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，获得一个大小约为 1300bp 的特异性扩增条带，随后将测序结果用 GenBank 数据库中的 Blast 软件与已知枯草芽胞杆菌的 16S rDNA 序列进行序列比对分析。结果表明：该枯草芽胞杆菌与枯草芽胞杆菌 FZB42 具有相似的序列，相似性为 97%。根据上述分析结果可判定，两种枯草芽胞杆菌为同属细菌（李元召等，2013）。筛选出 α-淀粉酶高产菌株，对其发酵特性及分类鉴定进行研究，为丰富产淀粉酶菌种资源和进一步挖掘该菌株的应用价值奠定基础。通过初筛、复筛获得高酶活菌株 XW86，利用传统的形态观察、系统生理生化反应并结合 16S rDNA 的序列分析，经 Blast 序列比对构建其系统进化树，确定其分类定位。通过单因素选择试验及进一步的正交试验和多因素交互试验，进行产酶条件优化。菌株 XW86 与已报道的枯草芽胞杆菌（*B. subtilis* QD517）亲缘关系最近，二者的 16S rDNA 序列相似性为 99%，生理生化反应谱与 16S rDNA 序列

分析一致鉴定为枯草芽胞杆菌。菌株 XW86 最适产酶条件为：在 LB 基础培养基中添加 0.75%吐温、0.5%淀粉，初始 pH6.5，35℃培养 120h。液体发酵得到的粗酶液酶活可高达 2200U/dl，比优化前提高 2.8 倍。初步鉴定菌株 XW86 为枯草芽胞杆菌，产酶因素的最佳组合对其淀粉酶活性有很大的优化空间。该野生型菌株可为淀粉酶发酵工业新备选菌株的开发应用提供资源，也为进一步克隆获得产淀粉酶基因的研究奠定基础（陈相达等，2011）。从乌鲁木齐地区啤酒厂、面粉厂、酱醋厂等地采集的酒渣、麸皮和酱渣中筛选淀粉酶产生菌，筛选采用可溶性淀粉培养基和 K-KI 染色；活性测定采用硝基水杨酸法；菌株鉴定使用法国梅里埃细菌自动鉴定仪。得到 9 株酶活较高的淀粉酶产生菌，其中一株编号为 A-1 的菌株酶活最高达 28.17U/ml，生理生化反应鉴定为枯草芽胞杆菌；并对其酶学性质研究表明，该淀粉酶的最适温度为 90℃，最适 pH 为 8.0，最适碳源为玉米粉，最适氮源为黄豆粉，该菌株为碱性高温淀粉酶产生菌（宋素琴等，2010）。利用高效表达载体 pWB980，实现了 *B. subtilis* BF7658 中温 α-淀粉酶基因 *amy* 在 *B. subtilis* DB403 中的高效表达，活力达 770U/ml。经多步纯化，重组酶 AMY 的比活达 35.8U/mg，纯化倍数为 1.7，获得凝胶电泳条带单一的蛋白质样品，经 SDS-PAGE 检测，重组酶 AMY 相对分子质量为 $4.8×10^4$。对酶学性质进行分析，重组酶 AMY 的最适反应温度为 60℃，最适反应 pH 为 6.0（刘逸寒等，2011）。对 BS796 所产中温 α-淀粉酶的最适反应温度、热稳定性、最适酶反应 pH 及酶的 pH 稳定性等进行了系统的研究，同时研究了钙离子对酶稳定性的作用，为该酶在工业上的广泛应用提供了一定的理论基础（邬敏辰，1996）。根据 GenBank 枯草芽胞杆菌 α-淀粉酶基因序列设计引物，以枯草芽胞杆菌基因组为模板，PCR 克隆 α-淀粉酶基因（*amy*），将 α-淀粉酶基因插入穿梭表达载体 pP43C 中，构建重组质粒 pP43Camy。随后将重组质粒转化 8 种蛋白酶缺陷的宿主枯草芽胞杆菌 WB800，经筛选获得重组枯草芽胞杆菌 α-淀粉酶基因工程菌 WB800/pP43Camy1026，工程菌摇瓶发酵酶活性达 960U。酶学性质研究表明，重组 α-淀粉酶的最适作用温度为 70℃，最适反应 pH 为 6.0，具有良好的应用潜力（谢光蓉等，2012）。研究了紫外线处理对枯草芽胞杆菌 BF7658 产酸性 α-淀粉酶的影响。结果表明：采用 30W 紫外线照射 90s 获得较好的突变效果；利用变色圈法初筛结合摇瓶发酵复筛，筛选得到一株理想的突变株 UV-12，其酶活为 3418.8U/ml，比初发菌株提高了 59.7%；对 UV-12 进行紫外线二次诱变，酶活提高不显著，表现出一定的“抗性”（游玟娟，2010）。

（7）蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）

在实验室中，用蜡状芽胞杆菌 β-淀粉酶代替 20%、30%和 40%的大麦芽，即将酿制啤酒的原料与辅助料比由传统工艺的 7∶3 改为 5∶5、4∶6 和 3∶7。3 种不同比例原料、辅助料制成麦芽汁，发酵制得啤酒，与对照酒相比，均无异味，采用 5∶5 和 4∶6 工艺试产啤酒均获成功，用此新工艺比传统工艺节省工业用粮，降低了生产成本（徐桃献和杨家兴，1994）。对蜡状芽胞杆菌发酵生产 α-淀粉酶的产酶条件进行了优化研究，考查了 11 种因素对其产酶的影响。先利用单因素试验对培养基及培养条件进行优化，在此基础上利用 Plackett-Burman（PB）试验设计法对影响 α-淀粉酶产量的重要因素进行筛选。结果表明，以麸皮为碳源，黄豆粉为氮源，碳氮比为 1∶0.75，初始 pH 为 7.0，37℃培养时，产酶量最高。通过 PB 试验进一步筛选表明，装液量、培养时间和麸皮含量 3 个

因素对产酶影响显著。试验初步优化了蜡状芽胞杆菌产 α-淀粉酶条件，为日后进一步优化和生产奠定了基础（董斯明等，2011）。从土壤中筛选出一株淀粉酶分泌能力较强的菌株，通过形态学观察、生理生化实验、16S rDNA 测序分析等方法对该菌株进行了鉴定，并对其分泌的淀粉酶的酶学性质进行了研究。经鉴定该菌株为蜡状芽胞杆菌，酶学性质研究表明，该酶的最适温度为 40℃，最适 pH 为 5.0～6.0，在 40℃保温 20min，酶活性下降 70%左右。Ca^{2+}对酶的活性和热稳定性没有激活作用。非变性蛋白电泳和淀粉酶活性染色结果显示，该菌易产生一种淀粉酶。通过高效液相色谱分析，该酶对可溶性淀粉的主要水解产物为糊精、寡聚糖和少量葡萄糖，表明该酶为 α-淀粉酶（刘洋等，2010）。

（8）凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）

从西藏当雄温泉附近的土壤中，分离到一株能在 55℃生长并分泌高温 α-淀粉酶的菌株，经初步鉴定为凝结芽胞杆菌，命名为 *B. coagulans* LS-1。该菌株用紫外线和亚硝基胍诱变，在 55℃摇瓶培养条件下，筛选到一个发酵液酶活达 100U/ml 的突变株，较初发菌株的酶活提高了约 25 倍，发酵液经 90℃处理 60min，酶活性保持在 90%以上（卢涛等，2002）。

（9）嗜碱芽胞杆菌（*B. alcalophillus*）

从近百份土样、水样中，筛选出一株产碱性淀粉酶的嗜碱芽胞杆菌 BC-A36，在碱性培养基上生长良好，最适生长 pH 为 9.5～11.0。起始 pH10.0～11.0，34℃摇瓶发酵 36h，酶活性达 418U/ml。酶的作用温度为 20～45℃时，最适作用 pH 为 10.0 左右（刘建军和姜鲁燕，1996）。

（10）嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌（*G. stearothermophilus*）

以嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌为初始菌种，经过诱变筛选，得到产异淀粉酶的突变菌株 UM761，酶活在原始菌种产酶水平的基础上提高了 2～3 倍。对菌株 UM761 的产酶条件进行了优化，结果表明：最适产酶菌株培养条件是以 1%葡萄糖作为碳源，牛肉膏、蛋白胨和酵母粉的混合物作为氮源，温度 44～46℃，培养时间 48～64h，培养基初始 pH6.2～6.5。金属离子 Co^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}对异淀粉酶有较强的激活作用，而 Fe^{3+}、Fe^{2+}对酶则有较强的抑制作用（胡先望等，2012）。从淀粉厂的酸性土壤中筛选得到一株产酸性 α-淀粉酶的野生菌 YX-1，此菌株具有较高的产酶能力，初步鉴定为 *G. stearothermophilus*。菌株 YX-1 能够产生两种 α-淀粉酶，在其发酵过程中具有两个产酶高峰，提取两个产酶期的粗酶 EⅠ和 EⅡ，经特性分析发现两种酶的最适 pH 分别为 4.5 和 5.0，最适温度均为 60℃（张丽苹和徐岩，2002）。土耳其研究人员将嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌 α-淀粉酶基因单独或与透明颤菌血红蛋白基因一起克隆到 pUC8 载体，并转移到大肠杆菌菌株中形成可以产 α-淀粉酶的菌株。用 LB 肉汤培养并将培养物加入饮水中饲喂肉鸡。饲喂添加大肠杆菌培养物肉鸡的采食量、日增重、饲料转化率都比对照显著提高。此外，还可以显著提高干物质和有机物的表观消化率，显著增加肠绒毛和隐窝的长度，显著提高血清和肠道内容物的淀粉酶活性。研究结果表明，产 α-淀粉酶的活大肠杆菌培养物可以起到抗生素生长促进剂的作用，在替代抗生素作为肉鸡生长促进剂方面具有很大的潜力（李凯年摘译，2006）。

二、碳源对芽胞杆菌产淀粉酶的影响

以酵母粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、CMC-Na、淀粉+CMC 分别为碳源，考察芽胞杆菌 FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）淀粉酶活性，实验结果见图 2-44。由图 2-44 可知，芽胞杆菌 FJAT-14231 以酵母粉为碳源时，其淀粉酶活性最高，酶活性达 1817.7U/ml；以蔗糖为碳源时，淀粉酶活较低，其酶仅 142.6U/ml；以麦芽糖、葡萄糖作为淀粉酶底物，对蛋白酶具有抑制作用，而淀粉作为淀粉酶底物，高浓度的底物也会因底物抑制效应而阻遏产酶菌株的生长和产酶能力。以不同碳源对芽胞杆菌 FJAT-14231 进行发酵产酶实验，对淀粉酶活性进行测定，得出以酵母粉为碳源时，芽胞杆菌 FJAT-14231 产淀粉酶活最高，酶活为 1817.7U/ml。从产淀粉酶菌株应用情况出发，可以选择合适碳源如酵母粉进行发酵产酶。

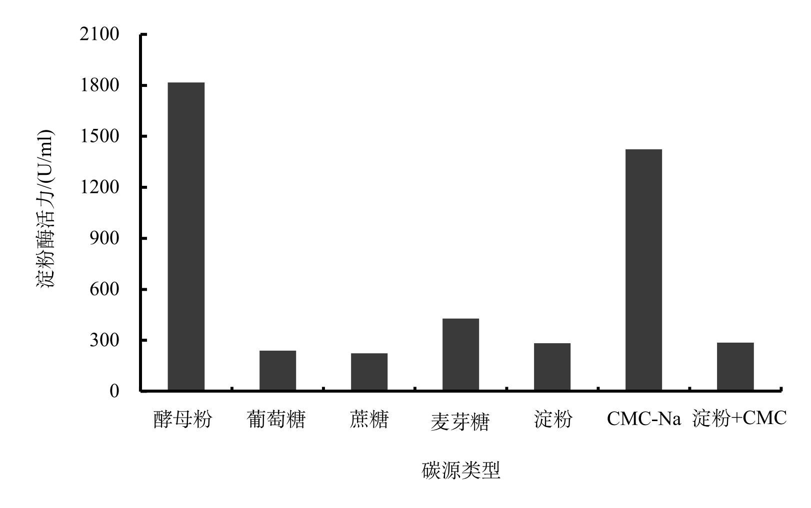


图 2-44　不同碳源对菌株 FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）产淀粉酶的影响

三、发酵时间对芽胞杆菌产淀粉酶的影响

以芽胞杆菌 FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）为例，将取出的发酵液吸取 1ml 至装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-1} 浓度，依次稀释配置成 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}…；超净台上无菌操作，溶液在振荡器上振荡 10s ，吸取 100μl 至相应浓度的平板上，溶液滴至平板中央，用涂布棒涂匀并静置 30min，使溶液完全渗透进平板中。每个梯度重复 3 次。用袋子装好，30℃恒温箱培养 1～2d。统计平板上的菌落数，算出每一稀释度菌落的平均数。菌落数计算公式：每毫升发酵液中菌体数量＝同一稀释度的菌落平均数×稀释倍数。以时间轴为横轴，活菌数为纵轴绘制生长曲线。取发酵液 6000r/min 离心 10min，取上清液适当稀释分别测定发酵液中纤维素酶、淀粉酶活性。

从图 2-45 可见，芽胞杆菌 FJAT-8758 在发酵培养基中的延滞期为 0～4h，对数生长期为 4～24h，稳定期为 24h 以后，且在 24～44h 出现了二次生长。淀粉酶均从 8h 后急剧上升，在 36h 时达最大值，为 1372.0U/ml。在 36～44h 淀粉酶有所下降，但在 48h 之

后淀粉酶基本保持稳定。

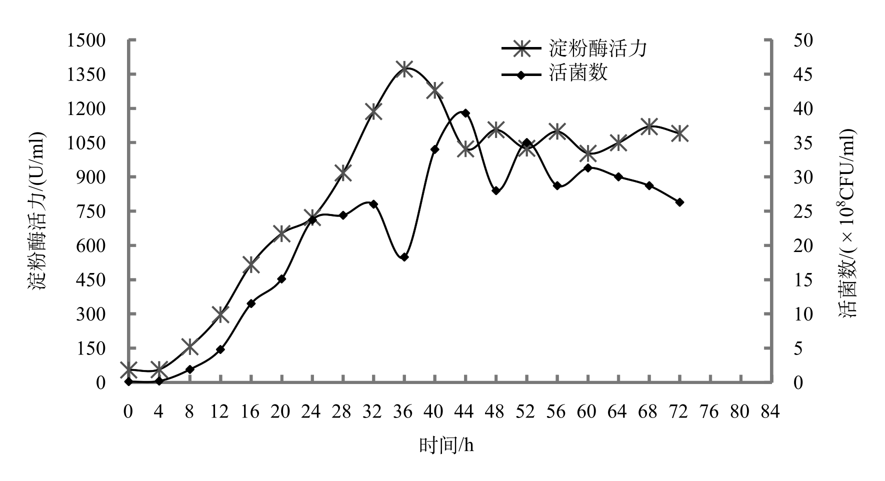
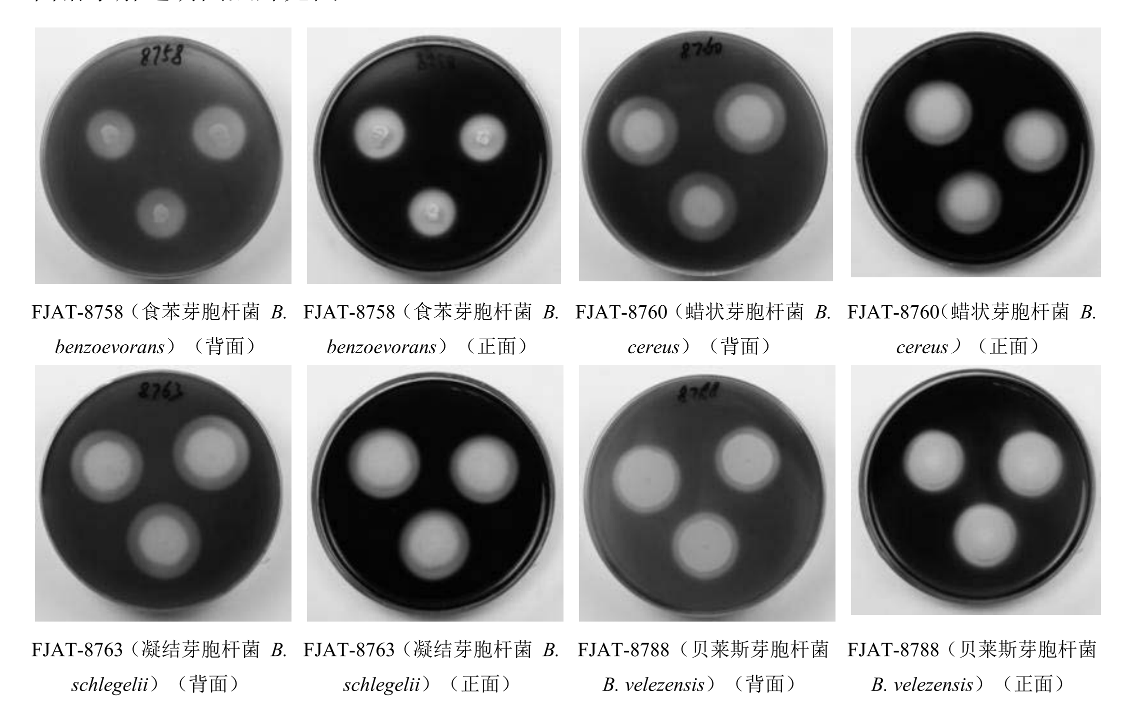


图 2-45　食苯芽胞杆菌 FJAT-8758（*Bacillus benzoevorans*）产酶及生长曲线

四、芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈测定

使用了 120 种芽胞杆菌进行淀粉酶活性检测，只有 32 种芽胞杆菌能产生淀粉酶，其菌落水解透明圈照片见图 2-46。



FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）（背面）　FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）（正面）　FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）（背面）　FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）（正面）

FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. schlegelii*）（背面）　FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. schlegelii*）（正面）　FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）（背面）　FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）（正面）

图 2-46　芽胞杆菌产淀粉酶水解透明圈

五、芽胞杆菌产淀粉酶特性分析

研究测定了 120 种芽胞杆菌，只有 32 种芽胞杆菌具有淀粉酶活性，其水解透明圈 *H*/*C* 值和淀粉酶活性见表 2-35。从表中可知，①不同种类的芽胞杆菌产淀粉酶的能力差异很大；②芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值为 1.21～6.98，种类间淀粉酶生产能力相差 5 倍；③芽胞杆菌淀粉酶活性为 2.54～290.77，种类间淀粉酶生产能力相差 116 倍；④芽胞杆菌种类间的淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值与蛋白酶活性之间无线性相关关系。

表 2-35　芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H/C* 值与酶活性

	菌株名称	*H*/*C* 值	酶活性/（U/ml）
1	FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）	1.21	50.05
2	FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）	1.32	43.62
3	FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*）	1.36	4.41
4	FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）	1.38	261.6
5	FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）	1.45	194.93
6	FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）	1.55	42.716
7	FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌 *B. flexus*）	1.56	71.67
8	FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）	1.57	30.55
9	FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）	1.61	5.37
10	FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）	1.67	13.98
11	FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）	1.7	59.45
12	FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）	1.7	256.8
13	FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）	1.75	272.33
14	FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）	1.8	2.54
15	FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）	1.85	19.03
16	FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）	1.89	114.7
17	FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）	2.32	89.84
18	FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）	2.37	113.85
19	FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）	2.46	181.09
20	FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）	2.49	126.36
21	FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）	2.57	251.15
22	FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）	2.67	288.54
23	FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）	2.69	87.86
24	FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）	2.9	175.44
25	FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）	3.02	234.2
26	FJAT-8761（环状芽胞杆菌 *B. circulans*）	3.1	9.87
27	FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）	3.12	119.22
28	FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）	3.12	290.77
29	FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）	3.2	47.23
30	FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）	3.23	212.06

续表

菌株名称	H/C 值	酶活性/（U/ml）
31　FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）	3.54	171.48
32　FJAT-8780（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*）	6.89	33.78

六、芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-35 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-47，可以将 32 种芽胞杆菌产淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为 3 类。

第 1 类：淀粉酶水解透明圈中等，*H*/*C* 值范围 2.32～3.54，包含 15 种芽胞杆菌，即 FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-8761（环状芽胞杆菌 *B. circulans*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）。

第 2 类：淀粉酶水解透明圈较小，*H*/*C* 值小于 1.21～1.89，包括 16 种芽胞杆菌，即

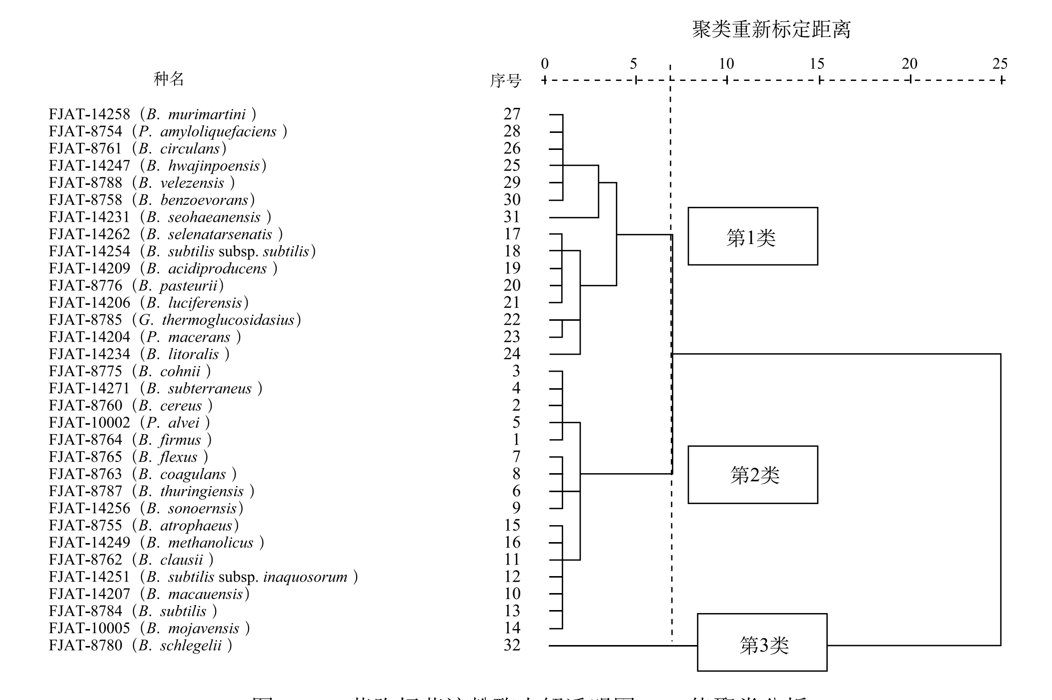


图 2-47　芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌 *B. flexus*）、FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）、FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）、FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）。

第 3 类：淀粉酶水解透明圈大，*H*/*C* 值大于 6.89，包含一种芽胞杆菌，即 FJAT-8780（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*）。

七、芽胞杆菌淀粉酶活性聚类分析

利用表 2-35 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌淀粉酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-48，可以将 32 种芽胞杆菌产淀粉酶活性分为两类。

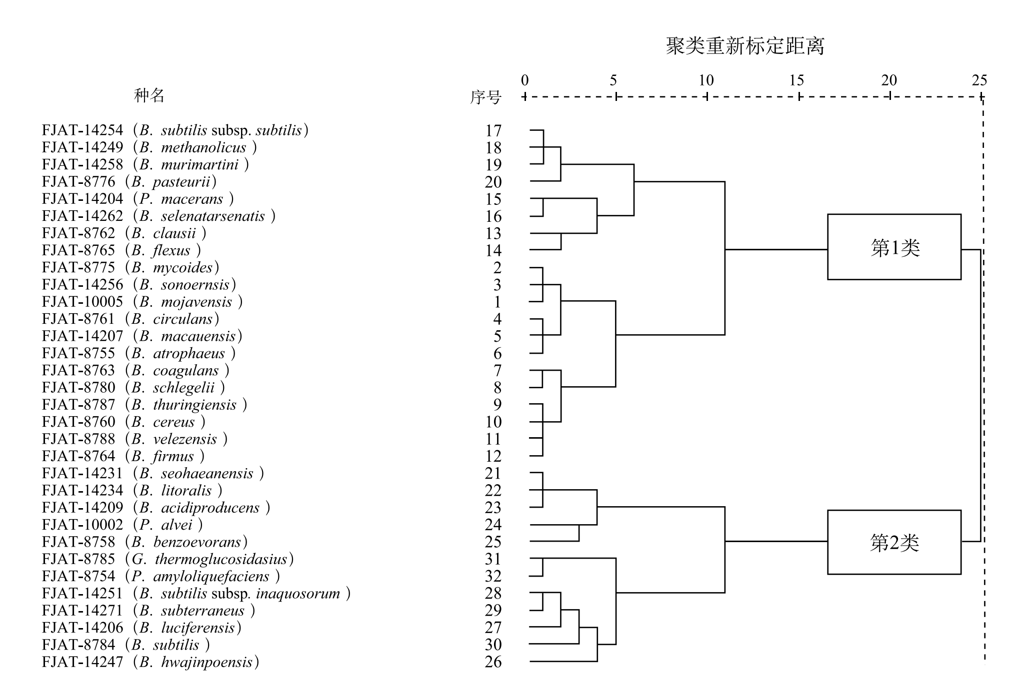


图 2-48　芽胞杆菌淀粉酶活性聚类分析

第 1 类：淀粉酶活性小于 126.36U/ml，包含 20 种芽胞杆菌，即 FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）、FJAT-8761（环状芽胞杆菌 *B. circulans*）、FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-8780（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*）、FJAT-8787

（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）、FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌 *B. flexus*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）。

第 2 类：淀粉酶活性为 171.78～290.77U/ml，包含 12 种芽胞杆菌，即 FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B.acidiproducens*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）。

八、芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择既测定过淀粉酶水解透明圈，又测定了淀粉酶活性的 32 种芽胞杆菌，建立数据矩阵。芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在 4 种类型：①芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值大而淀粉酶活性低，如 FJAT-8780（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*），*H*/*C* 值 6.89，淀粉酶活性仅为 33.78U/ml；②芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而淀粉酶活性高，如 FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*），*H*/*C* 值为 1.38，而淀粉酶活性高达 261.6U/ml；③芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H/C* 值较大同时淀粉酶活性高，如 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*），*H*/*C* 值 3.12，淀粉酶活性为 290.77U/ml；④芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈 *H*/*C* 值小同时淀粉酶活性低，如 FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*），*H*/*C* 值为 1.36，而淀粉酶活性仅为 4.41U/ml。芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈和淀粉酶活性经常是不同步的，淀粉酶水解透明圈的测定代表芽胞杆菌整个生长期产淀粉酶的特性。

利用表 2-35 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 32 种芽胞杆菌的淀粉酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-49。芽胞杆菌淀粉酶活性可以分为 4 类。

第 1 类：12 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌蛋白酶活性较低，范围为 2.54～50.05U/ml，蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化差异较大，范围为 1.21～6.89。包括的种类有 FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）、FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-8761（环状芽胞杆菌 *B. circulans*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8780

（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*）。

第 2 类：8 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌蛋白酶活性中等，范围为 59.45～126.36U/ml，蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化差异较小，范围为 1.56～3.12。包括的种类有 FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌 *B. flexus*）、FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）。

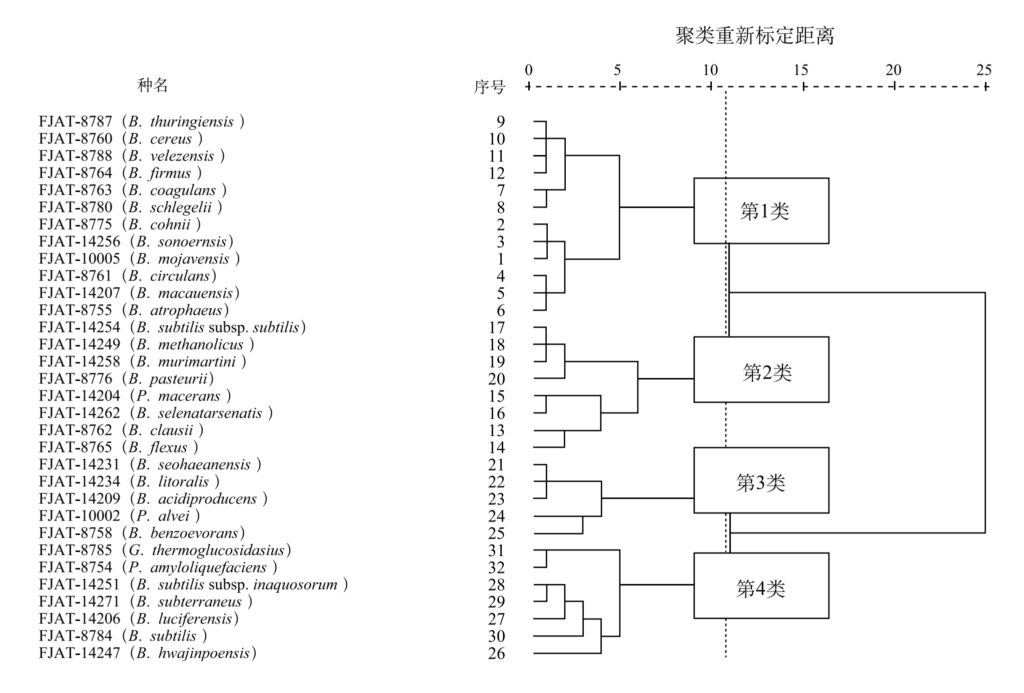


图 2-49　芽胞杆菌淀粉酶水解透明圈与淀粉酶活性的相互关系聚类分析

第 3 类：5 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌蛋白酶活性较高，范围为 171.48～212.06U/ml，蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化差异较小，范围为 1.45～3.54。包括的种类有 FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-14209（*B. acidiproducens*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）。

第 4 类：7 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌蛋白酶活性最高，范围为 234.20～290.77U/ml，蛋白酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化差异较小，范围为 1.38～3.12。包括的种类有 FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）。

第七节　芽胞杆菌产果胶酶特性

一、概述

芽胞杆菌普遍能产生果胶酶，在国内有5种芽胞杆菌产果胶酶特性的研究，综述如下。

（1）地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）

通过PCR扩增的方法，从实验室筛选保存的*B. licheniformis* DG-3菌株中扩增出碱性果胶酶的结构基因*pelA*，序列分析表明，所获*pelA*基因与已报道的*B. licheniformis* 14A菌株的*pelA*基因的同源性为100%。将*pelA*基因在大肠杆菌中表达，发酵液菌体的碱性果胶酶酶活为12U/ml。4～8mmol/L的Ca^{2+}对碱性果胶酶具有显著的激活作用（刘连成等，2008）。从污物中分离出一株兼性厌氧芽胞杆菌，它可产生大量的果胶酶，该菌株生长pH范围广，生长最高温度为50℃左右，它适应性强，生长快，在实验室中以它的菌落形态、个体形态、生理特性和生化反应、生态环境、生活史等作为分类依据（郭爱莲，1996）。从云南亚麻沤麻水、种植土、沤麻残渣堆积土中粗筛获得51株具有果胶酶活性的菌株，通过几种酶活性测定，获得果胶酶和木聚糖酶（主要的半纤维素酶）活性较高、无纤维素酶活性且脱胶周期短的目的菌株4株。基于4个菌株的果胶分解能力、沤麻周期长短及沤麻的效果等指标，最终确认YN1.1是优良的亚麻脱胶菌株。经16S rRNA基因测序和生理生化鉴定，该菌株为芽胞杆菌属的地衣芽胞杆菌（吴丽艳等，2007）。

（2）环状芽胞杆菌（*B. circulans*）

寄生于南方亚麻茎秆上的环状芽胞杆菌发酵产生的果胶酶和木聚糖酶采用$(NH_4)_2SO_4$沉淀与半透膜透析、CM-Sephadex C-50凝胶离子交换柱层析、Sephadex G-100凝胶柱层析分离纯化，经鉴定果胶裂解酶和木聚糖酶基本达到电泳纯，果胶裂解酶两个亚基的相对分子质量分别为32 253、27 400，木聚糖酶两个亚基的相对分子质量分别为86 489、57 422；果胶裂解酶和木聚糖酶最适反应温度为45℃；果胶裂解酶最适反应pH为10.5，木聚糖酶最适反应pH为7；对果胶裂解酶而言，K^+、Mg^{2+}有轻度的抑制作用，Fe^{2+}、Cu^{2+}有强抑制作用，Ca^{2+}有一定的激活作用；对木聚糖酶，K^+、Mg^{2+}有轻微抑制作用，Cu^{2+}有强抑制作用，Ca^{2+}和Fe^{2+}有一定的激活作用（李立恒等，2007）。为了开发亚麻酶法脱胶新技术，提高高效脱胶菌种A6产果胶酶的能力，对影响环状芽胞杆菌A6的产酶条件进行了研究，结果表明，菌株A6的最佳产酶条件为：亚麻茎粉7%、硫酸铵1%、磷酸氢二钾0.15%，pH7.5，温度35℃，菌龄24h，接种量5%，250ml三角瓶装液量70ml，摇瓶转速200r/min，产酶时间20h，果胶酶酶活高达7800U/ml，适合亚麻沤麻酶制剂的开发研究（黄小龙等，2004）。

（3）克劳氏芽胞杆菌（*B. clausii*）

以克劳氏芽胞杆菌S-4碱性果胶酶诱导黄瓜黄化苗，研究了该激发子对黄瓜生理生化特性的影响，探究碱性果胶酶诱导黄瓜抗病的机理。结果表明，黄瓜黄化苗经碱性果胶酶诱导后，过氧化物酶、多酚氧化酶和过氧化氢酶活性上升，可溶性蛋白和维生素C含量升高，丙二醛和游离脯氨酸含量下降，碱性果胶酶诱导黄瓜抗病作用与植物体内多种防御相关物质的诱导密切相关（李祖明等，2008）。对碱性果胶酶诱导黄瓜抗病作用

进行了研究，结果表明，吉氏芽胞杆菌 S-2（*B. gibsonii* S-2）和克劳氏芽胞杆菌 S-4（*B. clausii* S-4）发酵生产的碱性果胶酶对黄瓜黄化苗具有诱导抗病作用。在不同酶活的处理中，S-2（200U/ml）和 S-4（20U/ml）碱性果胶酶对黄瓜叶和茎上黑星病的病情指数降低最多，其诱导防病效果分别达 73.7%、80.0%和 80.6%、86.6%。pH 变化对碱性果胶酶的诱导抗病作用影响显著，碱性果胶酶 S-2（200U/ml）和 S-4（20U/ml）在 pH8.0 时诱导防病效果较好，它们对黄瓜叶和茎上黑星病的诱导防病效果分别达 64.8%、78.5%和 75.0%、87.8%（李祖明等，2008）。

（4）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

枯草芽胞杆菌为大多数动物肠道中的过路菌群，被世界各国列为允许在畜禽体内使用的益生素生产菌种。其作为饲料添加剂的作用主要有以下几方面：其一，枯草芽胞杆菌以其内生孢子进入动物消化道内，虽然不能增殖，但能迅速生长发育并分泌活性很强的胞外酶——蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、果胶酶、纤维素酶、葡聚糖酶，这些活性酶直接作用于动物消化道的“酶池”，降解饲料中相应的营养成分，提高饲料中营养成分的消化率，从而提高蛋白质和能量的利用率，降低料肉比（王振华和潘康成，2007）。以果胶为唯一碳源筛选到一株产果胶酶的菌株 JLSP-13，通过菌落形态观察、生理生化指标试验和 16S rDNA 保守序列分析，鉴定菌株 JLSP-13 为枯草芽胞杆菌，命名为 *B. subtilis* JLSP-13。采用响应面法（RSM）优化其产酶条件，并系统研究产物酶学性质。结果表明：*B. subtilis* JLSP-13 的最佳发酵时间为 25.02h，添加可溶性淀粉和果胶的最佳浓度分别为 0.61%和 0.042%，*B. subtilis* JLSP-13 果胶酶（BpgA）活性最大预测值达 38.8U/ml，验证值为 37.6U/ml，是基础培养基的 2.6 倍。BpgA 的最适温度为 60℃，T_m 为 82.9℃，其热稳定性较好；最适 pH 为 6.0，在 pH6.0～8.0 时较稳定；K_m 和 v_m 分别为 5.128mg/ml、12.92mg/（ml·min），BpgA 能快速降低果胶底物的黏度（白兰芳等，2011）。为制取适用于纺织用碱性果胶酶，必须得到高酶活的发酵液，通过促进剂的单因素试验及正交试验，对 *B. subtilis* WSH02-02 产生碱性果胶酸裂解酶的摇瓶发酵条件进行了优化，优化后该菌株产酶活比对照提高了 30%，所采用的促进剂优化组合为：Tween-60 3g/L、$CaCO_3$ 7g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 4g/L（陈坚等，2003）。在枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 168 菌株，以及在其改造菌株 *B. subtilis* 168wprA-和 *B. subtilis* 168/wprA∷csaA 中表达来自耐盐芽胞杆菌 C-125 的碱性果胶酶和来自巨大芽胞杆菌的青霉素酰化酶。碱性果胶酶在 *B. subtilis* 中分泌表达时，敲除了 *wprA* 蛋白酶基因的 *B. subtilis* 168wprA-菌株，相对于其野生型菌株 *B. subtilis*168，分泌表达的总的酶活性下降了 36%，再次整合 *csaA* 进入 *wprA* 位点后的 *B. subtilis* 168/wprA∷csaA 菌株，其表达量又恢复到相当于野生型菌株的表达水平。青霉素酰化酶在 *B. subtilis* 168wprA-菌株中的表达与野生型相比没有明显差异；而整合 *csaA* 进入 *wprA* 位点后的菌株 *B. subtilis*168/wprA∷csaA，相对于野生型其总的酶活性高出 66%，说明分子伴侣 csaA 数量的增加可以明显提高酶的表达量，并显示出普遍提高蛋白质总活力的作用，而蛋白酶 *wprA* 基因的敲除，对某些蛋白质的表达量能够产生明显的影响，在提高表达的稳定性方面表现出普遍的促进作用。实验表达的青霉素酰化酶酶活性（14.7U/ml）比工业应用中的酶活性（10U/ml）高出了 47%（蒋红亮等，2011）。对碱性果胶酶高产菌株的产酶条件进行优化，通过筛选得到一株产碱性果胶酶的枯草芽胞杆

菌 TCCC11286，利用单因素试验对其发酵条件进行优化。采用 Plackett-Burman 设计筛选出对产酶有重要影响的 3 个因素（豆饼粉、$MgSO_4$ 以及 $FeSO_4$ 的添加量），并采用响应面试验设计对重要因素进行优化。最适的产酶条件为：玉米粉 4%、豆饼粉 3.55%、$MgSO_4$ 0.034%、（NH_4）$_2SO_4$ 0.4%、磷酸盐 0.05mol/L、$FeSO_4$ 0.013%。优化后其产酶能力得到了明显的提高，酶活提高到 14.82U/ml（刘曦等，2008）。枯草芽胞杆菌 FM208849 是从罗布麻表皮中筛选到的一株高效产果胶酶的菌株，对罗布麻的生物脱胶效果明显。从菌种生长与诱导物两个方面对枯草芽胞杆菌 FM208849 产酶发酵条件进行优化，并对所产果胶酶催化反应条件进行了初步分析。结果表明：最佳产酶培养基为果胶与葡萄糖共 4g/L（质量比为 1∶3）、牛肉膏 15g/L、NaCl 2g/L，最佳发酵时间为 24h。初步测定果胶酶的最适反应温度为 40℃，最适 pH 为 9.5，其分子质量为 39.3ku（翟秋梅等，2010）。原果胶酶是可以催化原果胶水解的酶类，广泛用于果胶生产、单细胞食品制备和棉织品的生化精炼中。实验对影响枯草芽胞杆菌 XZ2（*B. subtilis* XZ2）摇瓶发酵生产原果胶酶的相关因子，即豆粕的水提时间、水提液浓度、磷酸盐浓度、金属离子、发酵培养基初始 pH、接种量和接种龄等采用单因素试验进行了研究，在单因素试验基础上，选取 pH、接种量、Mg^{2+}、磷酸盐和转速等因素进行正交试验，结果表明发酵培养基初始 pH7.5，接种量 10%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.04%，磷酸盐缓冲液浓度为 0.20mol/L，摇床转速为 120r/min 的摇瓶发酵条件下，产酶酶活最高为 16.71U/ml（刘战民等，2005）。在研究天然水沤法脱胶的过程中，通过初筛、复筛，从沤麻主生物期的沤麻液中筛选出两株菌落周围产生透明圈较大、脱胶酶活较高的菌株。通过形态观察，并对其多项生理、生化指标进行了分析研究，初步鉴定并命名为枯草芽胞杆菌 A1 和 B1。初步加菌脱胶实验表明：枯草芽胞杆菌 A1 产生果胶酶、木聚糖酶，而不产生纤维素酶，脱胶周期为 72h；枯草芽胞杆菌 B1 产生果胶酶、木聚糖酶和纤维素酶，脱胶周期为 50h（黄小龙等，2004）。从公园的花土中分离出一株相对高产碱性果胶酶的菌株，经 16S rDNA 鉴定为枯草芽胞杆菌，命名为 TCCCC11286。在初步的酶学性质研究中表明，它耐高温、耐碱，最适作用温度为 45℃，到 60℃仍有酶活，最适作用 pH 为 8.0。经过培养基的初步优化，菌株 TCCCC11286 对于富含铵根离子的化学物质和淀粉具有很好的利用能力（牛永梅，2010）。

（5）饲料类芽胞杆菌（*P. pabuli*）

碱性果胶酶生产菌 *P. pabuli* WZ008 在种子培养基中生长具有自絮凝特性，研究了种子液菌体形态及其对碱性果胶酶生产的影响，结果表明絮状种子有利于产酶。种子培养基的优化结果表明，添加可溶性淀粉和 β-环糊精有利于维持自絮凝形态，同时生物量和发酵产酶水平得到提高；种子培养基初始 pH 偏碱性对自絮凝形态及产酶水平有显著影响，添加 pH 缓冲盐 K_2HPO_4 进一步稳定了自絮凝形态。种子培养基优化后，在 5L 罐上碱性果胶酶产量达 90U/ml（魏春等，2013）。

二、营养条件对芽胞杆菌产果胶酶的影响

1. 碳氮比对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，用 LB 液体培养基为基础培养

基（酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、水 1000ml，pH7.2～7.4）。果胶液体发酵培养基配方：果胶 8.0g、麦芽糖∶牛肉膏一共 15g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml，pH7.0。不同的碳氮比果胶酶发酵液培养基，一共进行 5 种处理，麦芽糖∶牛肉膏为 1∶1、1∶2、1∶3、2∶1、3∶1。具有产果胶酶能力的浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）制备种子液后，分别接种到不同碳氮比的液体发酵培养基中，在 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养，通过分析相对果胶酶产量来判断使用哪个碳氮比有最好的产酶效果。

实验结果见表 2-36 和图 2-50。表 2-36 表明，在碳素比例不变的情况下，随着氮素的增加，芽胞杆菌产果胶酶的量增大，如碳氮比为 1∶1 时，果胶酶相对产量达 40.1%；碳氮比为 1∶3 时，果胶酶相对产量达 163.1%；在氮素不变的条件下，碳素增加，也能提高芽胞杆菌产果胶酶的量（图 2-50），如碳氮比为 2∶1 时，果胶酶相对产量达 91.4%；碳氮比为 3∶1 时，果胶酶相对产量达 221.4%。从实验结果可以得出，最优碳源是麦芽糖，最优氮源是牛肉膏，在此基础培养基上找出最优的碳氮比。实验结果显示碳氮比为 3∶1（麦芽糖 11.25g、牛肉膏 3.75g）时果胶酶酶活达最高，果胶酶相对产量达 163.1%。

表 2-36 不同碳氮比对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

碳氮比	对照	A 组	B 组	C 组	OD 值	D-半乳糖醛酸/mg	果胶酶相对产量/%
1∶1	3.0187	3.0387	3.0839	3.0517	3.0581	0.0935	40.1
1∶2	2.9567	3.0559	3.0175	3.0914	3.0549	0.2332	100.0
1∶3	3.1649	3.3250	3.3379	3.3124	3.3252	0.3805	163.1
2∶1	3.3679	3.4412	3.4562	3.4741	3.4577	0.2131	91.4
3∶1	2.8769	3.1997	3.0468	3.0366	3.0944	0.5163	221.4

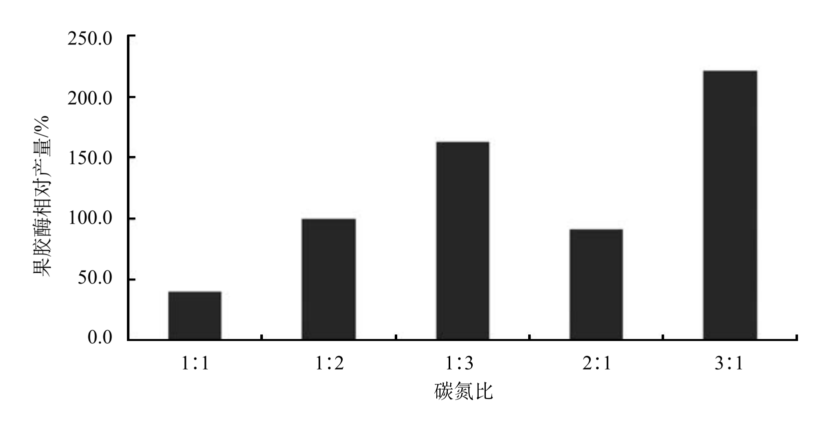


图 2-50 不同碳氮比对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

2. 碳源对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，液体发酵培养基配方：果胶 8.0g、酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g，水 1000ml，pH7.0。不同碳源的果胶酶发酵液培养基就是在原有液体发酵培养基上用葡萄糖 5.0g、蔗糖 5.0g、麦芽糖 5.0g、可溶性淀粉 5.0g 逐一代替酵母提取物 5.0g。具有产果胶酶能力的浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）制备种子液后，分别接种到不同碳源的液体发酵培养基中，在 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养，通过分析果胶酶相对产量来判断使用哪个碳源有最好的产酶效果，实验结果见表 2-37。

表 2-37　不同碳源对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

碳源	对照	A 组	B 组	C 组	OD 值	D-半乳糖醛酸含量/mg	果胶酶相对产量/%
酵母粉	2.9238	3.0581	3.1081	3.1989	3.1217	0.3962	100.0
麦芽糖	3.2145	3.4386	3.4563	3.4227	3.4392	0.4498	113.5
蔗糖	3.3703	3.5008	3.4683	3.5172	3.4954	0.2505	63.2
葡萄糖	3.2924	3.3610	3.5304	3.5556	3.4823	0.3802	96.0
玉米淀粉	3.5119	3.5161	3.5236	3.5681	3.5359	0.0481	12.1

实验结果表明，不同碳源对芽胞杆菌产果胶酶的影响差异显著，其中酵母粉（果胶酶相对产量 100%）和麦芽糖（113.5%）有利于果胶酶的产生，葡萄糖（96%）和蔗糖（63.2%）次之，玉米淀粉（12.1%）最差（图 2-51）。从实验结果可以看出，在基础培养基中用麦芽糖作为碳源是最好的培养方式，其他碳源无法达到相应水平，所以最优碳源为麦芽糖。

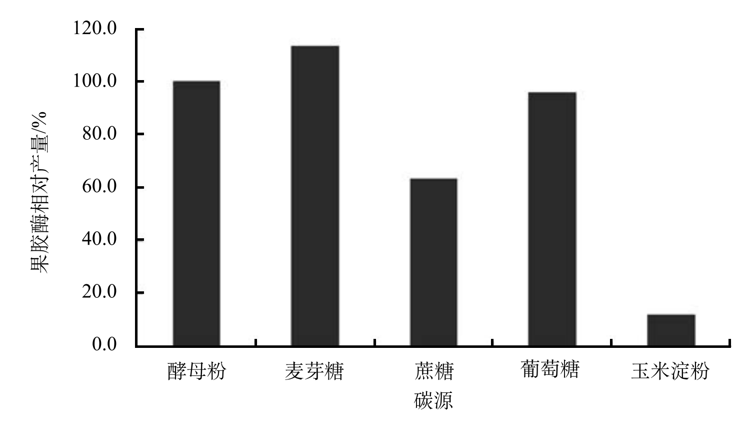


图 2-51　不同碳源对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

3. 氮源对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，液体发酵培养基：果胶 8.0g、

麦芽糖 5.0g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml，pH7.0。不同氮源的果胶酶发酵液培养基就是在原有液体发酵培养基上用牛肉膏 10.0g、尿素 10.0g、硝酸铵 10.0g、豆粕 10.0g 逐一代替蛋白胨 10.0g。具有产果胶酶能力的浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）制备种子液后，分别接种到不同氮源的液体发酵培养基中在 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养，通过分析果胶酶相对产量来判断使用哪个氮源有最好的产酶效果，实验结果见表 2-38 和图 2-52。

表 2-38　不同氮源对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

氮源	对照	A 组	B 组	C 组	OD 值	D-半乳糖醛酸含量/mg	果胶酶相对产量/%
牛肉膏	3.0466	3.1843	3.1727	3.4270	3.2613	0.4621	100.3
蛋白胨	3.1520	3.4102	3.3294	3.3585	3.3660	0.4606	100.0
硝酸铵	3.1932	3.2989	3.2936	3.2944	3.2956	0.0913	19.8
尿素	3.2900	3.3635	3.3671	3.3632	3.3646	0.1605	34.9
豆粕	3.2462	3.3722	3.4213	3.2958	3.3631	0.2516	54.6

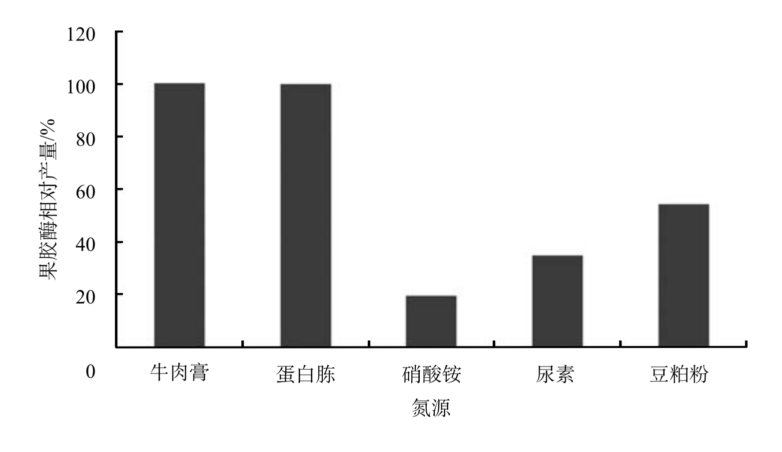


图 2-52　不同氮源对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

实验结果表明，不同氮源对芽胞杆菌产果胶酶能力影响显著，其中牛肉膏（果胶酶相对产量 100.3%）和蛋白胨（100.0%）有利于果胶酶的产生，豆粕（54.6%）、尿素（34.9%）次之，硝酸铵（19.8%）最差（图 2-52）。从实验结果可以看出，在基础培养基中用牛肉膏作为氮源，最有利于芽胞杆菌产果胶酶，其他氮源无法达相应的水平，最优氮源为牛肉膏。

4. 底物浓度对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，液体发酵培养基：果胶（0g、2.0g、4.0g、6.0g、8.0g、10.0g）、酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml，pH7.0。在 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养 36h，

测定菌株 FJAT-14204 产果胶酶的量，得到果胶酶 8g/L 时酶活最高。在进一步优化发酵工艺时以诱导物果胶 8g/L 的量进行实验。用移液枪吸取 1ml 种子液（2%的接种量），加入盛有 50ml 灭菌的不同底物浓度果胶酶发酵培养基的 250ml 三角瓶中。将三角瓶置于 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养。培养 36h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（5000r/min，10min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。通过产果胶酶酶活量来判断使用哪个浓度的底物有最好的产酶效果，实验结果见表 2-39 和图 2-53。实验结果表明，随着底物果胶浓度的增加，浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）产果胶酶的能力增加，底物果胶浓度在 4g/L 时，果胶酶的酶活达 37.77U/ml；底物果胶浓度在 8g/L 时，果胶酶的酶活达最高值 64.76U/ml（图 2-53）。

表 2-39　不同果胶浓度对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）产果胶酶的影响

果胶浓度/（g/L）	对照	A 组	B 组	C 组	D-半乳糖醛酸含量/mg	果胶酶酶活/（U/ml）
0	2.5075	2.5429	2.5844	2.5871	0.1359	22.64
2	2.3720	2.4562	2.4700	2.4575	0.1895	31.59
4	2.3400	2.4022	2.4694	2.4685	0.2266	37.77
6	2.4683	2.5490	2.5999	2.5970	0.2414	40.24
8	2.2958	2.5483	2.4324	2.4555	0.3886	64.76
10	2.2365	2.5406	2.2446	2.3762	0.3200	53.33

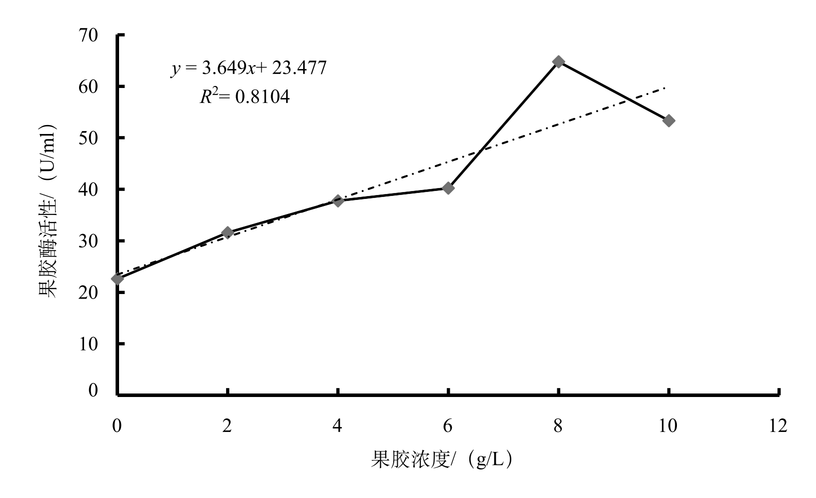


图 2-53　不同果胶浓度对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）产果胶酶的影响

三、培养条件对芽胞杆菌产果胶酶的影响

1. 培养温度对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，LB 液体培养基：酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、水 1000ml，pH7.2～7.4。液体发酵培养基：果胶 8.0g、

麦芽糖 11.25g、牛肉膏 3.75g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml，pH7.0。具有产果胶酶能力的浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）制备种子液后，分别接种到液体发酵培养基中，在转速为 170r/min，温度分别为 28℃、30℃、35℃、37℃、40℃恒温振荡摇床中培养，通过分析果胶酶相对产量来判断使用哪个温度有最好的产酶效果，实验结果见表 2-40 和图 2-54。

表 2-40　不同温度对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

温度/℃	对照	A 组	B 组	C 组	OD 值	D-半乳糖醛酸/mg	果胶酶相对产量/%
28	3.3902	3.5287	3.5334	3.5312	3.5311	0.3416	71.7
30	3.3218	3.5329	3.5468	3.4767	3.5188	0.4765	100.0
35	3.3375	3.6911	3.4782	3.5108	3.5600	0.5380	112.9
37	3.3028	3.5084	3.5140	3.5173	3.5132	0.5089	106.8
40	3.3533	3.5434	3.5385	3.5880	3.5566	0.4918	103.2

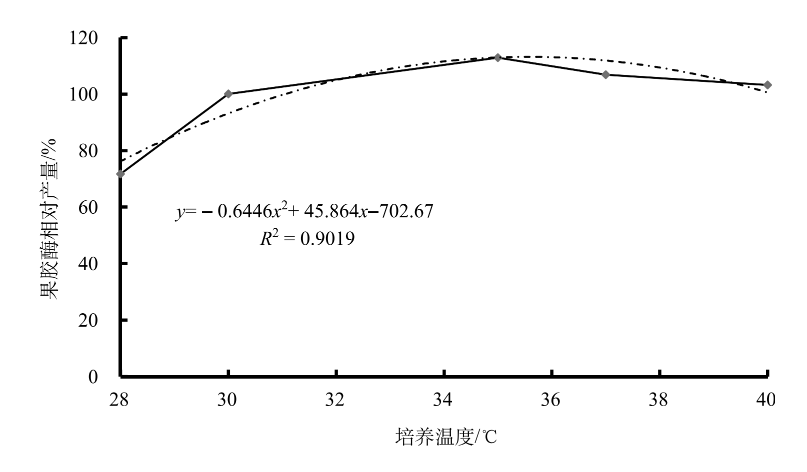


图 2-54　不同温度对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

实验结果表明，随着培养温度从 28℃增加到 40℃，浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量呈抛物线变化，从实验结果可以得出最优温度为 35℃，此时果胶酶酶活达最高，果胶酶相对产量达 112.9%，因此最优培养温度为 35℃。

2. 初始 pH 对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，LB 液体培养基：酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、水 1000ml，pH7.2～7.4。液体发酵培养基：果胶 8.0g、麦芽糖 11.25g、牛肉膏 3.75g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml。不同 pH 的培养基 pH 分别为 5、6、7、8、9。具有产果胶酶能力的浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）制备种子液后，接种到液体发酵培养基，一共有 5 种不同 pH 的培养基，然后放在温度为 35℃，转速为 150r/min 的恒温振荡摇床中培养，通

过分析果胶酶相对产量来判断使用哪个初始 pH 有最好的产酶效果，实验结果见表 2-41 和图 2-55。

表 2-41　不同初始 pH 对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

pH	对照	A 组	B 组	C 组	OD 值	D-半乳糖醛酸/mg	果胶酶相对产量/%
5	3.1615	3.2226	3.2289	3.2163	3.2226	0.2068	104.6
6	3.1928	3.2080	3.2721	3.3352	3.2718	0.2664	134.8
7	3.2626	3.3041	3.3479	3.3108	3.3209	0.1977	100.0
8	3.2820	3.2945	3.3002	3.2954	3.2967	0.0522	26.4
9	3.3156	3.3264	3.3297	3.3216	3.3259	0.03759	19.0

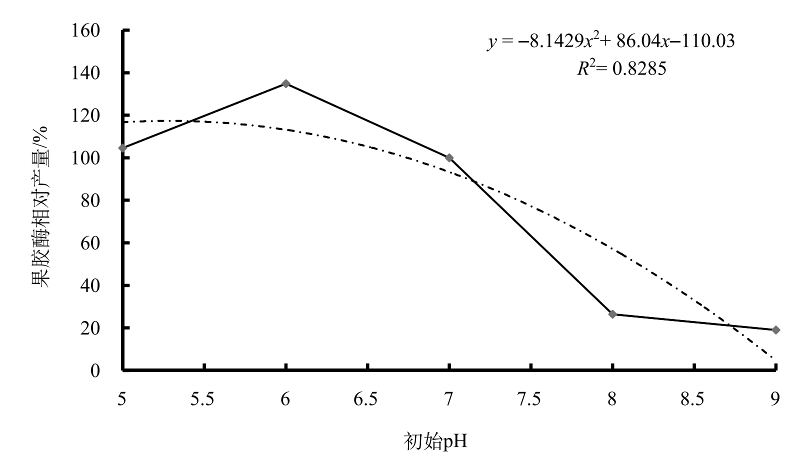


图 2-55　不同初始 pH 对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

从实验结果可以得出，最优初始 pH 为 6 时果胶酶酶活达最高，果胶酶相对产量最高，为原始产量的 134.8%，因此最优初始 pH 为 6。

3. 通气量（转速）对芽胞杆菌产果胶酶的影响

以浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）为例，LB 液体培养基：酵母提取物 5.0g、NaCl 5.0g、胰蛋白胨 10.0g、水 1000ml，pH7.2～7.4。液体发酵培养基：果胶 8.0g、麦芽糖 11.25g、牛肉膏 3.75g、NaCl 5.0g、蛋白胨 10.0g、KH_2PO_4 1.0g、K_2HPO_4 1.0g、水 1000ml，pH7.0。用移液枪吸取 1ml 种子液（2%的接种量），加入盛有 50ml 灭菌发酵培养基的 250ml 三角瓶中，然后放在温度为 37℃，转速分别为 130r/min、150r/min、170r/min、190r/min、210r/min 的摇床中进行培养。培养 36h 后取出，立即取 8ml 发酵液离心（5000r/min，10min）、收集发酵液，适当稀释，以备测定。通过分析果胶酶相对产量来判断使用哪个转速有最好的产酶效果，实验结果见表 2-42 和图 2-56。从实验结果可以得出最优转速为 150r/min，此时果胶酶酶活达最高，果胶酶相对产量最高。

表 2-42　不同转速对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

转速/(r/min)	对照	A 组	B 组	C 组	OD 值	D-半乳糖醛酸/mg	果胶酶相对产量/%
130	3.7082	3.823	3.8997	3.7870	3.8366	0.3524	120.0
150	3.6269	3.7460	3.8139	3.7489	3.7696	0.3917	133.4
170	3.7824	3.8805	3.8886	3.8989	3.8893	0.2935	100.0
190	3.7371	3.9377	3.7774	3.7401	3.8184	0.2232	76.0
210	3.8055	3.8833	3.8550	3.8324	3.8569	0.1411	48.1

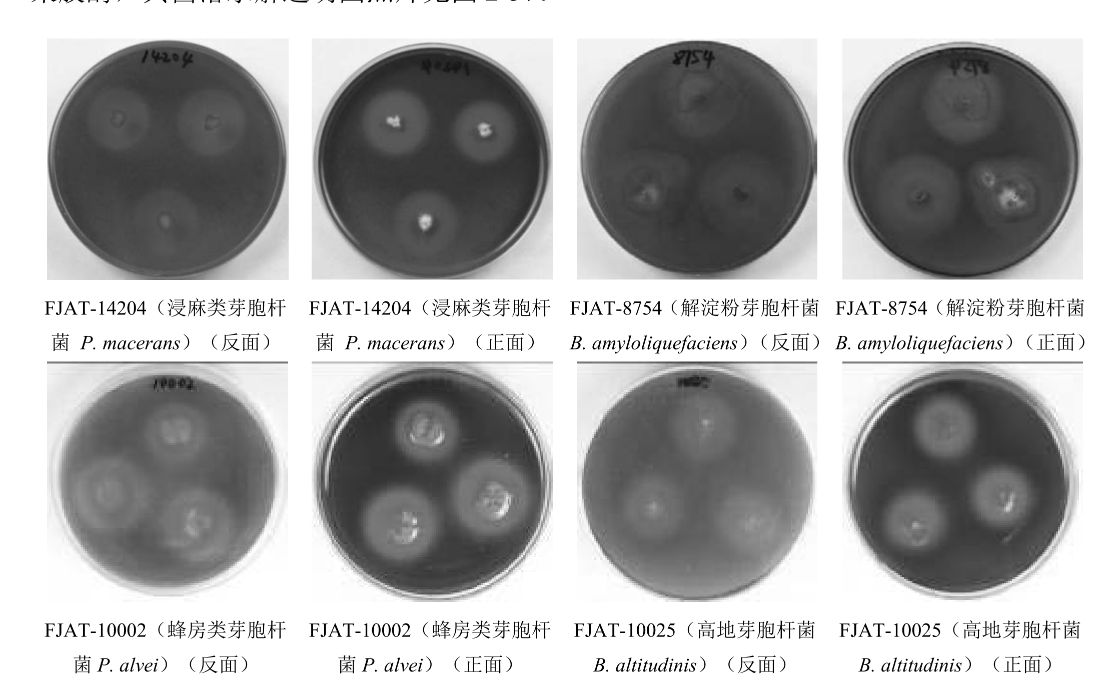
$y = -0.0131x^2 + 3.4383x - 100.79$

$R^2 = 0.946$

图 2-56　不同转速对浸麻类芽胞杆菌 FJAT-14204（*P. macerans*）果胶酶相对产量的影响

四、芽胞杆菌果胶酶水解透明圈测定

使用了 120 种芽胞杆菌（表 2-1）进行果胶酶活性检测，只有 42 种芽胞杆菌能产生果胶酶，其菌落水解透明圈照片见图 2-57。



FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）（反面）　FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）（正面）　FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）（反面）　FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）（正面）

FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）（反面）　FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）（正面）　FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）（反面）　FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）（正面）

图 2-57　芽胞杆菌果胶酶水解透明圈测定

五、芽胞杆菌产果胶酶特性分析

研究测定了 120 种芽胞杆菌，42 种芽胞杆菌具有果胶酶活性，其水解透明圈 *H*/*C* 值和果胶酶活性见表 2-43。从表中可知，①不同种类的芽胞杆菌产果胶酶的能力差异很大；②芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值为 1.47～5.12，种类间果胶酶生产能力相差 3.48 倍；③芽胞杆菌果胶酶活性为 4.88～46.32U/ml，种类间果胶酶生产能力相差 9.49 倍；④芽胞杆菌种类间的果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值与果胶酶活性之间无线性关系。

表 2-43　芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性

菌株编号	*H*/*C* 值	果胶酶活性/（U/ml）
FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）	4.74	4.88
FJAT-10007（软骨素类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）	1.83	4.95
FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）	1.95	6.32
FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）	2.22	6.78
FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）	3.08	7.92
FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）	5.12	8.37
FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）	3.92	9.67
FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）	2.64	9.75
FJAT-8777（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）	1.73	10.28
FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）	2.72	10.43
FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）	2.08	10.89
FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）	2.26	11.05
FJAT-8756（产氮芽胞杆菌 *B.azotoformans*）	3.18	12.25
FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）	2.11	12.26
FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）	2.16	15.45
FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）	2.29	15.91
FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）	2.25	16.06
FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）	4.23	16.75
FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）	2.47	17.05
FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）	3.67	17.28
FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）	2.28	18.20
FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）	1.53	19.19
FJAT-8753 （短短芽胞杆菌 *B. brevis*）	2.39	19.29
FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）	2.29	20.63
FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）	1.61	20.70
FJAT-8769（右旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus*）	2.32	21.70
FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）	1.93	21.77
FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）	1.67	22.27

续表

菌株编号	H/C 值	果胶酶活性/（U/ml）
FJAT-14253（大安芽胞杆菌 *B. taeanensis*）	2.29	22.61
FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）	2.02	22.76
FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）	2.00	22.91
FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）	3.42	23.07
FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）	1.47	23.61
FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）	1.56	25.50
FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）	1.55	25.57
FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）	2.12	25.83
FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）	3.03	27.79
FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）	2.67	30.46
FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）	1.64	31.06
FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）	1.92	31.06
FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）	3.19	40.04
FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）	1.56	46.32

六、芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-43 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-58，可以将 42 种芽胞杆菌产果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为 3 类。

第 1 类：果胶酶水解透明圈较小，*H*/*C* 值为 1.47～2.47，其包含了 29 种芽胞杆菌，即 FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8777（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）、FJAT-10007（软骨素类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）、FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-14253（大安芽胞杆菌 *B. taeanensis*）、FJAT-8769（右旋乳酸芽

胞杆菌 *B. laevolacticus*）、FJAT-8753 （短短芽胞杆菌 *B. brevis*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）。

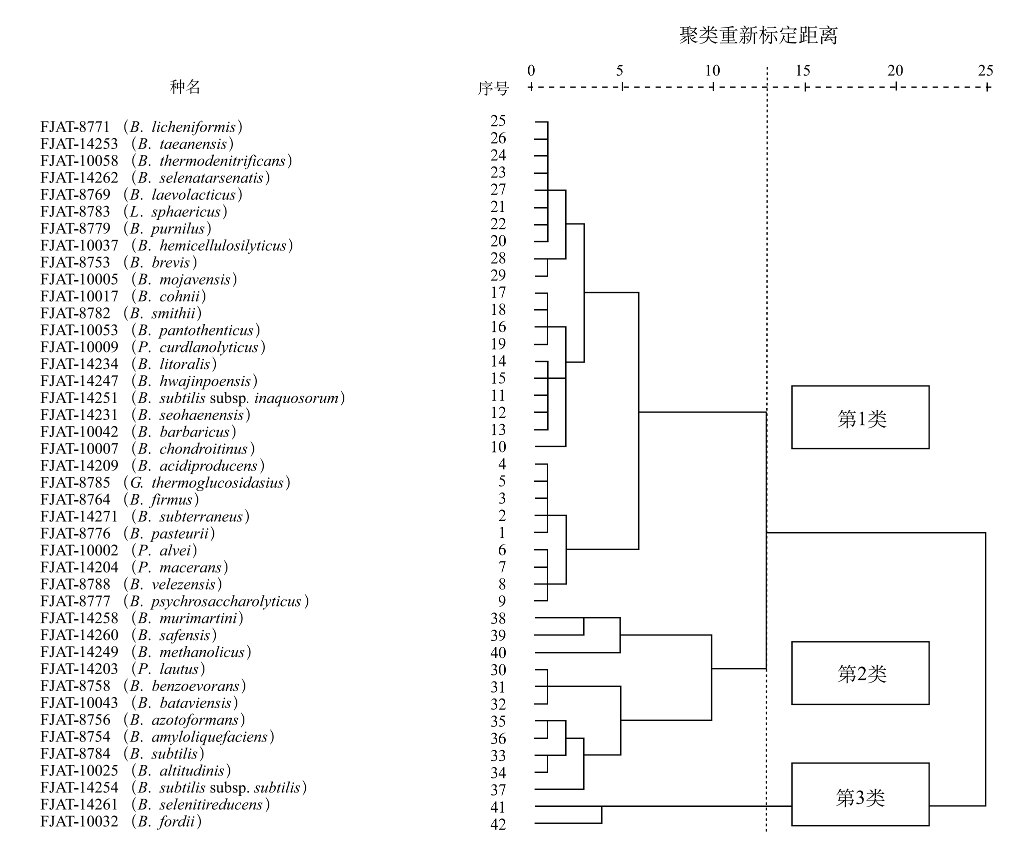


图 2-58　芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

第 2 类：果胶酶水解透明圈中等，*H*/*C* 值为 2.64～4.23，其包括了 11 个芽胞杆菌，即 FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-8756（产氮芽胞杆菌 *B. azotoformans*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）。

第 3 类：果胶酶水解透明圈较大，*H*/*C* 值为 4.74～5.12，其包含了 2 种芽胞杆菌，即 FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）、FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）。

七、芽胞杆菌果胶酶活性聚类分析

利用表 2-43 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 42 种芽胞杆菌的果胶酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-59。芽胞杆菌果胶酶活性可以分为 3 类。

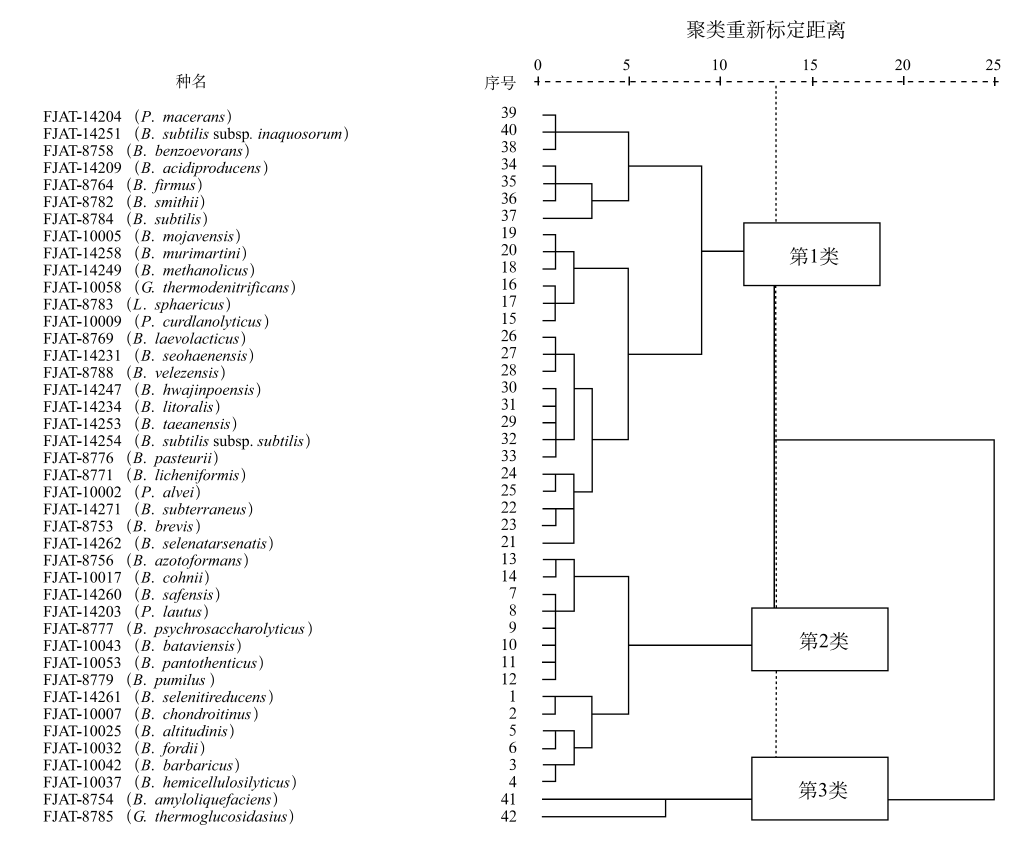


图 2-59　芽胞杆菌果胶酶活性聚类分析

第 1 类：该类芽胞杆菌果胶酶活性中等，为 15.45～31.06U/ml，其包含了 26 种芽胞杆菌，即 FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-8753（短短芽胞杆菌 *B. brevis*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-8769（右旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-14253（大安芽胞杆菌 *B. taeanensis*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）。

第 2 类：芽胞杆菌果胶酶活性较低，为 4.88～12.26U/ml，其包含了 14 种芽胞杆菌，即 FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）、FJAT-10007（软骨素类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）、FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-8777（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）、FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-8756（产氮芽胞杆菌 *B. azotoformans*）、FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）。

第 3 类：芽胞杆菌果胶酶活性较高，为 40.04～46.32U/ml，其包含了两种芽胞杆菌，即 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷地芽胞杆菌 *B. thermoglucosidasius*）。

八、芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择既测定过果胶酶水解透明圈，又测定过果胶酶活性的 42 种芽胞杆菌，建立数据矩阵（表 2-43）。芽胞杆菌果胶酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在 4 种类型：①芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值大而果胶酶活性低，如 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）的 *H*/*C* 值较高，为 3.92，而果胶酶活性较低，仅为 9.67U/ml；②芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而果胶酶活性高，如 FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）*H*/*C* 值小，为 1.56，果胶酶活性高，为 46.32U/ml；③芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值大同时果胶酶活性高，如 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）*H*/*C* 值大，为 3.19，果胶酶活性高，为 40.04U/ml；④芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值小同时果胶酶活性低，如 FJAT-10007（软骨素类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）*H*/*C* 值小，为 1.83，果胶酶活性低，为 4.95U/ml。芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值和果胶酶活性经常是不同步的，这与其生物学特性有关，作者检测时期，也许是芽胞杆菌果胶酶检测的最好时期，但对于果胶酶水解透明圈的测定不是最佳时期，同样，培养条件、营养条件、菌株种类等都对它们有影响。

以欧氏距离为尺度，用类平均法进行聚类分析，聚类图见图 2-60。聚类结果基于果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值与果胶酶活性将芽胞杆菌分为 3 类。

第 1 类：26 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌果胶酶活性较高，为 15.91～31.06U/ml，果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化较大，为 1.47～4.23，包括有 FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14247（花津滩芽杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-8783

（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-14253（大安芽胞杆菌 *B. taeanensis*）、FJAT-8769（右旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus*）、FJAT-8753 （短短芽胞杆菌 *B. brevis*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）。

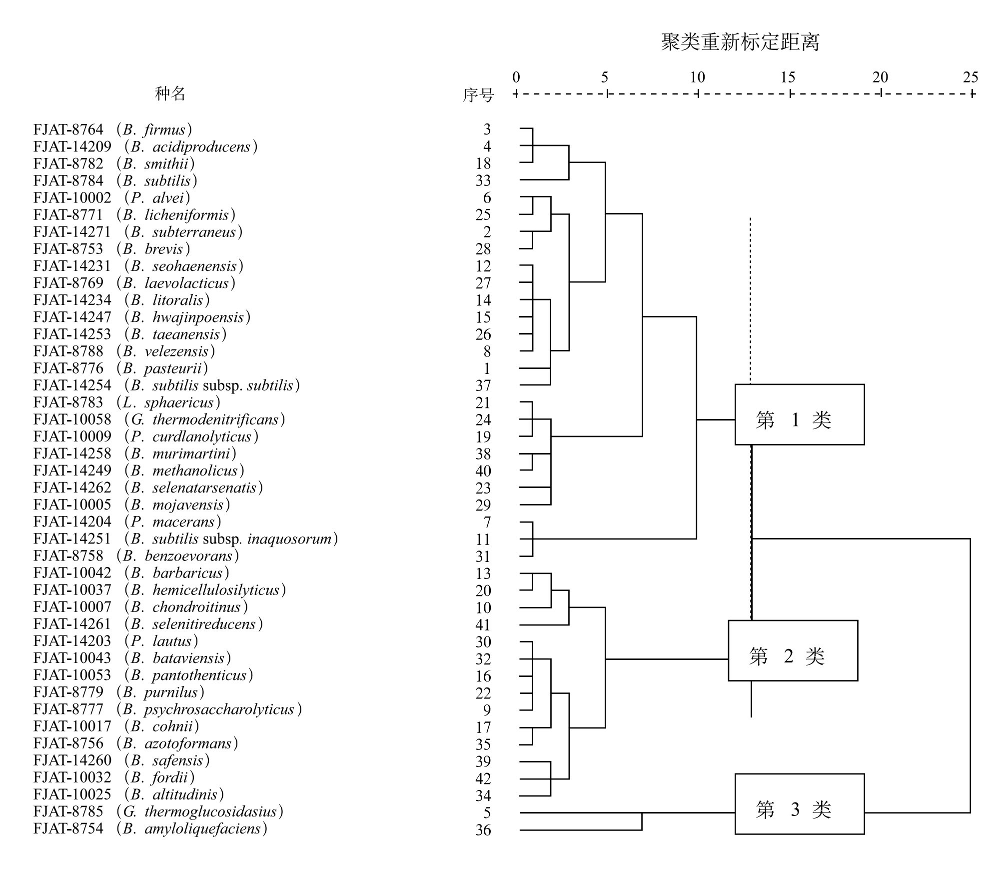


图 2-60　芽胞杆菌果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值与果胶酶活性的相互关系聚类分析

第 2 类：14 种芽胞杆菌聚为一类，其特点是果胶酶活性较低，为 4.88～12.26U/ml，果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值差异较大，为 1.73～5.12，包括 FJAT-8777（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）、FJAT-10007（软骨素类芽胞杆菌 *P. chondroitinus*）、FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）、FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）、FJAT-10017（科氏芽胞杆菌 *B. cohnii*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-8756（产氮芽胞杆菌 *B.azotoformans*）、FJAT-14260

（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）、FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）、FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）。

第 3 类：两种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌果胶酶活性为 40.04～46.32U/ml，果胶酶水解透明圈 *H*/*C* 值与果胶酶活性差异较大，*H*/*C* 值为 1.56～3.19，包括 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）。

第八节　芽胞杆菌产几丁质酶特性

一、概述

国内学者研究过 7 种芽胞杆菌产几丁质酶特性，综述如下。

（1）侧胞短芽胞杆菌（*Brevibacillus laterosporus*）

从 524 株芽胞杆菌中筛选出一株几丁质酶活性高的侧胞短芽胞杆菌 1.864。研究表明，该菌对小麦赤霉菌等 6 种病原真菌具有明显的抑制作用。通过几丁质酶抑制剂及酶活性变化对抑制真菌活性的相关研究，初步认为该菌株的抑菌物质为几丁质酶。生物测定表明，菌株 1.864 的几丁质酶粗酶对蚊幼具杀虫作用，同时对 Bt 制剂杀虫活性具有明显的增效作用（赵秋敏等，2006）。

（2）地衣芽胞杆菌（*Bacillus licheniformis*）

系统研究了地衣芽胞杆菌复配苯噻酮菌株对溃疡病病菌生长的影响，对其拮抗因子几丁质酶及 β-1,3-葡聚糖酶活性进行分析，进而进行了其离体果控病试验及田间防治试验。结果表明，有益微生物地衣芽胞杆菌复配苯噻酮对脐橙溃疡病有明显的抑菌作用，可造成溃疡病病菌菌丝中空、扭曲、破损，β-1,3-葡聚糖酶抑制病菌生长，在发病前或发病初期喷布地衣芽胞杆菌复配苯噻酮对脐橙溃疡病有较好的防治作用（于宏安和郭早霞，2013）。从四川、陕西、浙江等地食用菌栽培的土壤样品中，筛选到一株性能优良、产几丁质酶活性较强的菌株 BLC08609，并结合菌落形态、生理生化指标和 16S rDNA 序列分析对其进行鉴定，结果显示，菌株 BLC08609 能以食用菌细胞壁（以几丁质为主）为唯一碳源生长，经个体形态、16S rDNA 测序鉴定，确定菌株 BLC08609 为地衣芽胞杆菌（鲜乔等，2009）。

（3）土壤短芽胞杆菌（*Brevibacillus agri*）

从短芽胞杆菌属短芽胞杆菌种分泌的胞外几丁质酶经过硫酸铵盐析、苯基琼脂糖疏水相互作用层析和 DEAE 阴离子交换层析提取，和其他来源的几丁质酶相比，该纯酶的独特之处在于它是一个由两个完全相同的亚基以疏水相互作用聚合而成的二聚体，常温下经过巯基乙醇处理后，该酶在 10% SDS 聚丙烯酰胺电泳显示的分子质量为 85kDa。沸水处理 3min 或用 5℃的 8mol/L 尿素溶液处理 10min 后，该酶在 10%SDS 聚丙烯酰胺电泳显示的分子质量为 48kDa，该酶的亚基解聚后，活性丧失，该酶的等电点为 5.5，水解几丁质的最适 pH 为 8.0，最适温度为 60℃，该酶的酸碱稳定区为 pH6.0～10.0，Ag^{+}和巯基乙醇能抑制酶活性，该纯酶的 N 端 10 个氨基酸残基依次是 AVSNSKIIGY，表明该酶

是一个尚未被发现的新几丁质酶，该纯酶水解几丁质的特征研究表明，该酶属一种内切几丁质酶，不具备外切几丁质酶的活力，和其他几丁质酶相比，该酶具有高度的热稳定性和蛋白质水解酶抗性，因此，可用于生物控制领域（李盛和顾真荣，2002）。利用平板分离法，从土壤中分离出一株能产几丁质酶的细菌，经初步鉴定为短芽胞杆菌属。研究了菌种在不同温度、pH、氮源、碳源下的产酶情况并进行了产酶条件优化。结果表明，此细菌的最适产酶条件是：30℃、pH7.0、蛋白胨 10g/L、细粉几丁质 10g/L。优化条件下的几丁质酶活性达 1.25U/ml（邓红梅等，2010）。

（4）环状芽胞杆菌（*Bacillus circulans*）

从北京地区的土样、砂样和水样中分离并纯化了产生几丁质酶的菌株，其中菌株 CT14 含几丁质酶活性最高，经对其细胞形态、菌落特征的观察和生化特性检测，证明该菌株是环状芽胞杆菌。其几丁质酶粗提液能抑制多种植物病原真菌的生长，表明它对植物病原真菌的拮抗作用具有广谱性（檀建新等，2001）。从健康烟草叶片中筛选出一株产几丁质酶活性较高的内生细菌 FEC-1，经 16S rDNA 基因序列和菌株生理生化特征分析，确定该菌株为环状芽胞杆菌。对菌株 FEC-1 产酶发酵条件研究表明，该几丁质酶是诱导酶，最佳氮源、碳源是酵母膏和 2g/L 单糖或二糖，多糖效果相对较差，最适初始 pH 为 9.0 左右，最适温度为 30℃左右。在优化条件下，摇瓶培养 60h 时产酶达 123.16U/ml（杨水英等，2007）。

（5）巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）

对含有外源几丁质酶编码基因的重组菌株——巨大芽胞杆菌 B13011 和 B13012 进行了小麦根际定殖能力、平板抑真菌能力和盆栽防病试验。两重组菌株均能在小麦根际及根内成功定殖；在盆栽条件下，对小麦全蚀病、小麦纹枯病、棉花立枯病、棉花枯萎病 4 种真菌病害的防效与受体菌 B1301 相比达显著性差异，其中菌株 B13011 对纹枯病的防治效果达到 81.61%。两重组菌株均能提高受试作物的生物量，其中菌株 B13011 提高棉花的生物量达 39.40%（杨合同等，2003）。

（6）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

对从自然界筛选获得的枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 515 菌株进行紫外线、氯化锂、硫酸二乙酯的复合诱变，获得了一株遗传稳定的高产几丁质酶活性菌株。采用正交试验设计对变异菌株的培养基和培养条件进行优化，采用其优化条件，使变异菌株单位发酵液的几丁质酶活性提高到了 1.53U/ml（张敏等，2010）。以黄瓜蔓枯病菌（*Ascochyta citrullina*）为指示菌，采用平板稀释法和对峙法对 48 份土样进行分离筛选，得到拮抗细菌 53 株，发现菌株 G8、Sh34 拮抗谱宽，对黄瓜蔓枯菌和菌核抑制效果均超过 76%，且能分泌几丁质酶。温室接种防病实验结果表明，两个菌株发酵液对黄瓜蔓枯病菌防治效果分别达 62.5%和 51.0%。根据对两个菌株 16S rDNA 序列分析，均被鉴定为枯草芽胞杆菌（董红强等，2008）。产几丁质酶枯草芽胞杆菌 G3 菌剂在盆栽试验中对菜豆苗期炭疽病和茄子苗期菌核病有一定的防治作用，其防治效果分别为 35.4%和 64.1%；对番茄叶霉有良好的防治作用，药后 3d 和 7d 的防效分别为 78.8%和 89.7%。另外，G3 菌剂对黄瓜和茄子苗期有明显的促生作用（顾真荣等，2002）。产几丁质酶枯草芽胞杆菌 G3 的固体培养物在黄瓜灰霉病菌和番茄叶霉病菌抑菌试验中证实，抑菌活性物质存在于过滤上清液

中，它们是从酸沉淀物中提取出的伊枯草菌素（iturin）、生物表面活性素（surfactin）和存在于盐析粗蛋白质中的几丁质酶。在叶霉孢子萌发试验中，伊枯草菌素微弱地抑制孢子萌发但强烈破坏芽管和新生菌丝；生物表面活性素和几丁质酶则强烈抑制孢子萌发并长久性地抑制芽管伸长。在PDA平板上的灰霉菌丝抑菌试验中，伊枯草菌素抑制菌丝生长，引发菌丝顶端膨大，形成泡囊，泡囊破裂后原生质外泄；几丁质酶抑制菌丝生长，引发菌丝产生不规则的菌丝团（顾真荣等，2004）。产几丁质酶枯草芽胞杆菌 G3 菌剂在土壤中可抑制水稻纹枯病菌菌核形成。菌剂的适宜剂量为 1.15×10^8CFU/g，温度、土壤含水量和菌剂处理的时间是影响其效果的因素。15～30℃培养，G3 菌剂处理的菌核减退率从35.2%逐步上升到77.8%。在16%～24%土壤含水量的条件下，菌核减退率从75.5%下降到21.7%。接种病原真菌前施用G3菌剂比接种后效果更好。菌剂添加豆粕、壳聚糖、葡萄糖和淀粉后有不同程度的增效作用，尤其是壳聚糖，增效率达 29.2%（顾真荣等，2005）。2000年以来，国内外已有多种枯草芽胞杆菌制剂被登记为生物杀菌剂，用于白粉病、灰霉病、叶霉病等病害防治。该类菌剂目前以产品中活芽胞数作为产品出厂的唯一指标，但直接杀菌的是其次级代谢产物。因此，需另行建立产品中抗真菌代谢产物生物效价的测定方法，作为产品内部质控辅助指标。从小麦根际土壤中分离到一株对多种植物病原真菌有拮抗作用且产蛋白酶的枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* T2，经紫外线（UV）和硫酸二乙酯（DES）诱变处理，获得具有良好遗传稳定性的蛋白酶正负突变株，与初发菌株相比，培养48h的正突变株胞外蛋白酶活性提高108.5%，负突变株蛋白酶活性降低81.1%，而二者的几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶活性均无显著变化，正突变株对棉花枯萎病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*）的平板拮抗作用增强，其粗酶液可使该菌菌丝变形膨大成珠状，原生质浓缩，萌发的孢子芽管短且畸形膨大；负突变株对该菌的平板拮抗作用显著降低，粗酶液对该菌菌丝和孢子的形态无明显作用，表明提高芽胞杆菌生防菌胞外蛋白酶的活力可增强其拮抗病原真菌的能力（李然等，2008）。研究内生枯草芽胞杆菌 BS-2 对荔枝采后果实霜疫病的防治效果，以及其对体内活性氧代谢（SOD、POD、CAT、MDA、超氧阴离子自由基的产生速率）和病程相关蛋白（β-1,3-葡聚糖酶活性、几丁质酶活性）等的影响。结果表明，菌株 BS-2 对荔枝霜疫病具有较好的防治效果，接种处理后 6d，其防治效果为 37.83%；葡聚糖酶活性、几丁质酶活性、CAT 和SOD活性均比病菌处理的高，而POD、PPO活性，以及膜透性、MDA含量与超氧阴离子自由基的产生速率比病菌处理的低。当接种后6d，经内生细菌处理的荔枝果皮的β-1,3-葡聚糖酶活性、几丁质酶活性和 SOD 活性分别比病菌处理的高 70.73%、30.76%和297.43%；而POD、PPO活性和超氧阴离子自由基的产生速率分别比病菌处理的低15.11%、4.96%和28.95%（蔡学清等，2010）。研究来源于苏云金芽胞杆菌的几丁质酶基因 *chiA* 在枯草芽胞杆菌中的表达情况。以苏云金芽胞杆菌染色体DNA为模板，PCR扩增获取几丁质酶基因 *chiA*，将其与枯草芽胞杆菌表达载体 pHSG 连接，构建重组菌，经 IPTG 诱导后，检测培养液中的几丁质酶活性。扩增得到几丁质酶基因 *chiA* 大小为 2.5kb。构建的重组菌对底物显示出一定的水解活性，培养液酶活约为2.8U/ml，而pHSG空质粒转化子在同样条件下其培养液没有明显酶活。该重组酶的最适pH为6.5，最适反应温度为50℃，与苏云金芽胞杆菌自身产生的几丁质酶性质一致。*chiA* 能在枯草芽胞杆菌中成功

表达，表达产物可成功分泌到细胞外（宋光明等，2008）。

（7）苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）

采用 PCR 方法扩增出苜蓿银纹夜蛾（*Autographa californica*）核型多角体病毒（AcMNPV）几丁质酶基因（*chiA*）编码区 1.6kb 全长片段，并将该片段分别克隆至原核表达载体 pET30a 和杆状病毒 BactoBac 表达系统转移载体 pFastBac 中，分别在大肠杆菌（*Escherichia coli*）菌株 BL21（DE3）和草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）细胞系 Sf-9 中进行表达。SDS-PAGE 分析表明，在大肠杆菌和昆虫细胞中均有效表达了 60kDa 的蛋白质。将表达产物饲喂 5 龄棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）幼虫后取其围食膜，扫描电镜结果显示，围食膜结构遭到破坏形成大量孔洞。生物测定结果表明，以上两种表达产物对苏云金芽胞杆菌（Bt）和核型多角体病毒（NPV）均具有增效作用。以 AcMNPVChiA 在大肠杆菌和细胞系 Sf-9 中的表达产物分别与 BtCry2Ac 蛋白混合饲喂棉铃虫初孵幼虫，增效率分别为 33.4%和 54.5%，其半致死时间 LT_{50} 较对照处理分别缩短了 17.8h 和 20.6h；当 AcMNPVChiA 在大肠杆菌和细胞系 Sf-9 中的表达产物分别与甘蓝夜蛾（*Mamestra brassicae*）核型多角体病毒（MbNPV）混合处理棉铃虫初孵幼虫时，其 LT50 与对照比较分别缩短了 16.6h 和 22.4h（刘文霞等，2008）。从 80 株 Bt 菌株中筛选出两株几丁质酶活性高的菌株 QB51 和 HD7，并通过比色法测定了两菌株分别在不同 pH 条件下的酶产量，发现两菌株均在 pH 为 7.0 时产酶量最大，分别为 355U/ml 和 314U/ml，无论是在酸性还是碱性诱导条件下酶产量均明显降低。以甜菜夜蛾初孵幼虫为对象的生物测定，菌株 DL5789 有明显的增效活性，增效效果分别为 2.35 倍和 1.52 倍。SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析表明，这两株 Bt 菌株所产生的几丁质酶分子质量均为 61kDa（祁红兵和刘铭，2003）。从本实验室分离得到的 406 株苏云金芽胞杆菌中，以甜菜夜蛾为供试昆虫，采用生物测定的方法，筛选出一株对甜菜夜蛾高效的菌株 WY-190，确定其发酵原液半致死浓度 LC_{50} 为 0.25μl/ml。对菌株 WY-190 的形态特征、生理生化特性和伴胞晶体蛋白进行了观察和研究。研究结果表明，菌株 WY-190 属于 H3a3b 血清型，SDS-PAGE 图谱表明主要由 135kDa 和 65kDa 两种蛋白质成分组成，在菌株生长形态、发酵培养特征、生理生化特性方面与生产菌株 HD-1 的差别不大，主要差异表现在对甜菜夜蛾的敏感性和杀虫毒力上（牛桂兰和闫建平，2002）。利用几丁质平板法和几丁质酶基因特异引物 PCR 两种方法，对本室保藏的 995 株苏云金芽胞杆菌的几丁质酶及其基因进行了检测，结果显示所有被检测的菌株都可以在以几丁质为唯一碳源的平板上生长，其中 93.0%的菌株 PCR 检测阳性，54.1%的菌株可产生明显的水解圈，证明苏云金芽胞杆菌几丁质酶活性高低与其血清型及杀虫晶体蛋白基因的类型无相关性；同时对 286 个菌株进行了抑小麦赤霉菌实验，筛选出 19 株抑真菌效果较好的苏云金芽胞杆菌（卢焦等，2007）。几丁质酶（EC3.2.1.14）是细菌、病毒、真菌等微生物、高等植物和昆虫体内普遍合成的一种具有生物催化活性的水解酶类，它能特异地催化水解几丁质的 β-1,4-糖苷键生成 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖（NAG）。几丁质酶因为具有水解几丁质破坏围食膜的作用而被作为防治真菌病害和害虫的潜在靶标（蒋红彬和蒋千里，2000）。几丁质酶能增强苏云金芽胞杆菌（Bt）的杀虫效果，有利于克服或延缓昆虫对 Bt 的抗性（黄小红等，2005）。以煮沸冻融法制备 PCR 扩增模板，利用苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*，Bt）

几丁质酶基因特异引物进行 15 个 Bt 血清变种的扩增分析，获得 9 个几丁质酶的全长基因扩增产物。经克隆和序列测定，从 *Bt* serovar. *entomocidus* HD109、*Bt* serovar. *canadensis* HD224、*Bt* serovar. *alesti* HD16 和 *Bt* serovar. *toumanoffi* HD201 等 4 个菌株中分离了几丁质酶新基因（林毅和关雄，2004）。对本实验室筛选的苏云金芽胞杆菌 QB-51 的产酶条件研究表明：在 pH7.0 的基本培养基中添加 2.0%的细粉几丁质、1.0%的蛋白胨，220r/min 30℃条件下培养 72h，几丁质酶的产量最高（祁红兵和刘铭，2003）。从苏云金芽胞杆菌以色列亚种（*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*）中提取基因组 DNA，通过合成一对特异性引物，用 touchdown PCR 的方法扩增几丁质酶 *ichi* 基因序列（GenBank 登录号：AF526379）。*ichi* 序列全长为 2570bp，含有一个 2067bp 的可读框（ORF），编码 688 个氨基酸，推测分子质量为 75.79kDa，等电点 pI 为 5.90 的几丁质酶前体。序列和结构比较分析表明：Ichi 氨基酸序列与蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）28-9 几丁质酶 CW、蜡状芽胞杆菌 CH 几丁质酶 B 及苏云金芽胞杆菌墨西哥亚种几丁质酶的同源性分别为 97.24%、97.18%、97.63%，而与苏云金芽胞杆菌巴基斯坦亚种的同源性只有 63.07%。Ichi 编码区由分泌信号肽（46AA）、催化区（105AA）、黏蛋白Ⅲ型同源区（74AA）及几丁质结合区（40AA）组成（钟万芳和姜利华，2003）。通过 PCR 方法从苏云金芽胞杆菌 010 克隆出几丁质酶基因 *chi36*，该基因可读框（ORF）的长度为 1083bp，编码 360 个氨基酸。氨基酸序列分析表明：Bt010 的 Chi36 与 Bt15A3、Bc28-9、Bc6E1 的 Chi36 相似性分别为 99%、99%和 96%，其 N 端为具有 27 个氨基酸的信号肽序列。该蛋白质归类为 18 家族几丁质酶，属于一种胞外酶。将 *chi36* 基因插入到 PGEX-KG 原核表达载体的表达框中，构建成原核表达载体并转化到大肠杆菌 *E.coli* BL21（DE3）进行蛋白质表达，酶活性测定结果表明，表达产物对几丁质有降解作用，在 pH 为 5.0、温度为 55℃时酶活性最高（黄必旺等，2011）。以苏云金芽胞杆菌科默尔亚种菌株 15A3 基因组 DNA 为模版，用 touchdown PCR 方法扩增几丁质酶 ChiA 和 ChiB 的全基因序列（GenBank 登录号：EF103273 和 DQ512474）。将 PCR 产物连接 pUCm-T 克隆载体，获得重组质粒 pUCm-chiA 和 pUCm-chiB，分别转化 *E.coli* XL-Blue。克隆的几丁质酶基因可以利用本身的启动子异源表达各自的蛋白质，不需要几丁质作为诱导物。表达的几丁质酶 15A3 菌株可组成型表达两种几丁质酶。经核苷酸及氨基酸序列分析证明，*chiA* 基因全长 1426bp，含有 343bp 的上游非编码区和 1083bp 的 ORF，编码 360 个氨基酸。推测成熟蛋白质分子质量为 36kDa，只有一个几丁质酶催化域。*chiB* 基因全长 2279bp，含有 248bp 的上游非编码区和 2031bp 的 ORF，编码 676 个氨基酸。推测成熟蛋白质分子质量约为 70.6kDa，具有 3 个功能域。核苷酸序列分析显示 *chiA* 和 *chiB* 的启动子所处的位置及转录起始碱基都不相同，−35 区相同，而−10 区有两个碱基不同，SD 序列也不完全一致（陈艳玲等，2007）。以苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种（*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*）基因组 DNA 为模板，利用一对特异性引物通过 touchdown PCR 方法扩增了长为 2576bp 的几丁质酶 *kchi* 基因序列（GenBank 登录号：AY189740）。生物信息学分析发现：该序列包含一个完整的可读框，编码 688 个氨基酸，推测是相对分子质量约为 75 820、等电点 pI 为 5.89 的几丁质酶前体。序列和结构比较分析结果表明：Kchi 属于几丁质内切酶，在 N 端还有一个分泌信号肽。除与肋巴基斯坦亚种几丁质酶同源性较低（相似性为 61.3%）外，与 Bt 其他亚种的

同源性都较高（≥92.0%）（钟万芳等，2008）。苏云金芽胞杆菌制剂作为无公害农药已经得到社会的认可，如果再开发其几丁质酶抑制真菌和杀虫增效功能，不仅可充分利用这一农业微生物菌种资源，也将给予传统生物农药以新的生命力。从苏云金芽胞杆菌T04A001 中提取基因组 DNA，通过 PCR 的方法克隆了几丁质酶 *chiAC* 基因（GenBank 登录号为 EF427670）。置换 *chiAC* 基因的启动子为 T7 启动子时，*chiAC* 基因能在 IPTG 诱导下在大肠杆菌中大量表达，并产生大小约 70kDa 的表达产物（蔡亚君等，2011）。苏云金芽胞杆菌是目前应用最广泛的杀虫微生物，其活性成分主要是杀虫晶体蛋白、营养期杀虫蛋白和几丁质酶等，对编码这些蛋白质的基因的定位的研究，有助于进一步研究基因结构、功能、表达和调控（伍赠玲等，2004）。以苏云金芽胞杆菌（Bt）的发酵液为材料，经硫酸铵分级分离、DEAE-32 离子交换柱层析分离，获得部分纯化的 Bt 几丁质酶（EC3.2.1.14）制剂。研究了几种有机溶剂对 Bt 几丁质酶的影响，结果表明，甲醇、丙三醇、甲醛和戊二醛对几丁质酶有抑制作用；乙醇、丙醇、乙二醇和二甲亚砜在低浓度时对酶有激活作用，随着浓度的升高表现出抑制作用；二氧六环的浓度低于 5%时，对酶的影响不明显，而高于 5%时，对酶则有激活作用；丙酮对酶有激活作用（黄小红等，2005）。BtCry 毒素广泛应用于害虫防治，但存在杀虫谱窄、活性低、靶标害虫易产生抗性等缺点。为了弥补这些不足，采取适当措施增强 Cry 毒素的杀虫作用十分必要。围绕 Cry 毒素的作用机理，研究了利用丝氨酸蛋白酶抑制剂、几丁质酶、增效蛋白、钙黏蛋白片段和 Cyt 毒素等增效因子提高 Cry 毒素的杀虫活性、延缓昆虫抗性的作用；探讨了利用基因定点突变、蛋白质融合和杂交及晶体蛋白末端小片段的去除等分子技术手段对毒素蛋白进行遗传改良，改善 Cry 毒素的杀虫性能，扩大其杀虫范围（张丽丽等，2010）。

二、培养条件对芽胞杆菌产几丁质酶的影响

芽胞杆菌 *B. subtilis* 515、*B. subtilis* 515-126 经 UV、LiCl+UV、DES 诱变得到。发酵条件的优化在发酵培养过程中，培养时间 18h 为最佳培养时间，此时的酶活达到 1.43U/ml（图 2-61）。随着时间的延长，酶活开始下降，可能为菌体老化，代谢能力下降，由此产生的酶活下降。使用 250ml 的三角瓶进行液体摇瓶发酵，装瓶量 50～60ml 时酶活较高，在 50ml 时达最高，为 1.47U/ml，当超过 70ml 时，酶活迅速下降（图 2-62）。酶活最大的最佳接种量为 6%～7%，在 7%时酶活达最大，为 1.41U/ml，在接种量为 1%～7%时，酶活随着接种量的增加而增大，接种量超过 7%时，酶活开始降低，可能是由于接种量增加，发酵液增大，导致溶氧不足，细菌的增殖缓慢，酶活降低（图 2-63）。在 pH6.5～7 时，菌株产酶活性最高，在 pH6.5 时达最高，为 1.49U/ml，几丁质的溶解度与 pH 有关，在 pH 大于 6.5 时几丁质不溶解，在 pH 为 7 时，几丁质有部分沉淀，pH 为 8 时，几丁质出现大量沉淀。而在 pH 为 6 时，几丁质完全溶解，但酸性条件下不利于细菌的生长，酶活降低（图 2-64）。由图 2-65 所示，培养温度在 30～35℃时，芽胞杆菌产酶活性最高，在 35℃时达到 1.48U/ml，温度继续升高后，酶活下降。

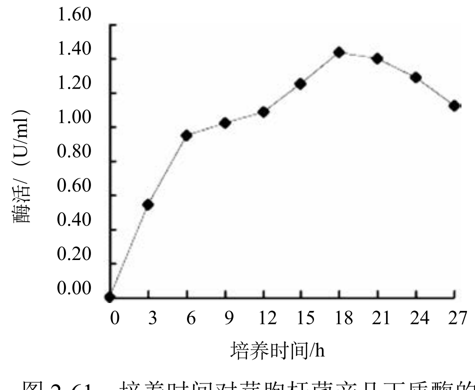


图 2-61　培养时间对芽胞杆菌产几丁质酶的影响

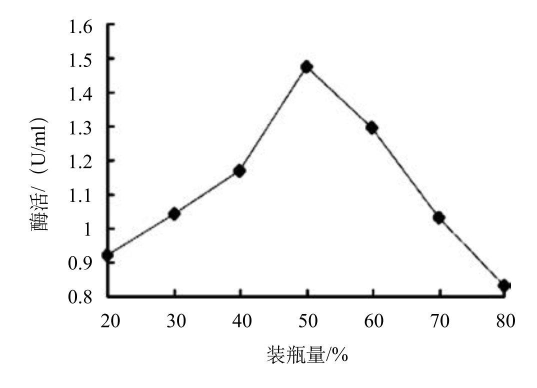


图 2-62　装瓶量对芽胞杆菌产几丁质酶的影响

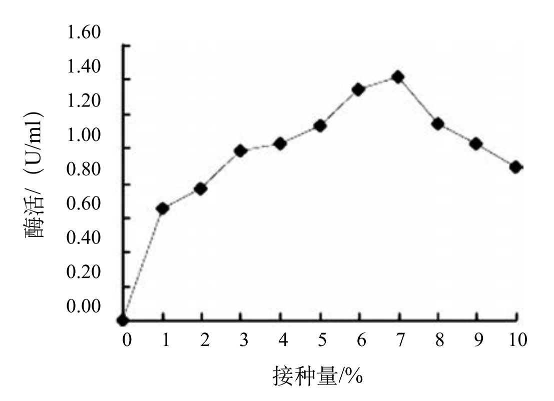


图 2-63　接种量对芽胞杆菌产几丁质酶的影响

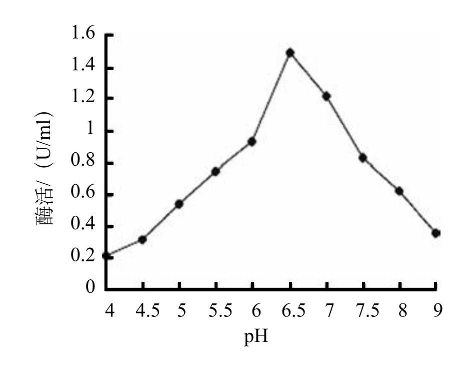


图 2-64　pH 对芽胞杆菌产几丁质酶的影响

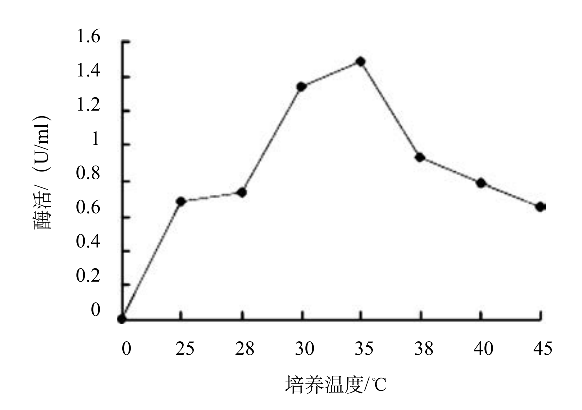
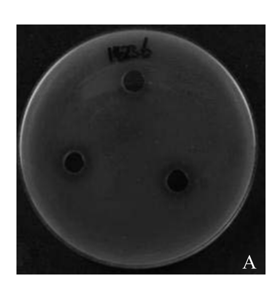


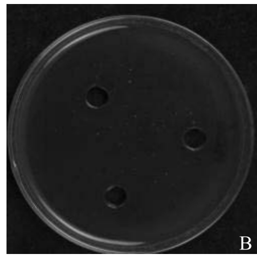
图 2-65　培养温度对芽胞杆菌产几丁质酶的影响

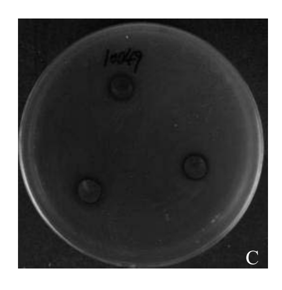
三、芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈测定

实验用芽胞杆菌均选自福建省农业科学院农业生物资源研究所菌种库。经实验观察测定，15 株芽胞杆菌的平板上有明显水解透明圈（图 2-66），分别是 FJAT -8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-8761（环状芽胞杆菌 *B. circulans*）、FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）、FJAT-8763

（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌 *B. flexus*）、FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌（*B. pasteurii*）、FJAT-8780（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）。







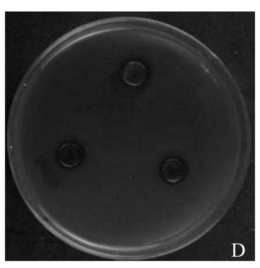


图 2-66　芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈的测定

A. FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌 *B. butanolivorans*）（反面）；B. FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌 *B. butanolivorans*）（正面）； C. FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）（反面）；D. FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）（正面）

四、芽胞杆菌几丁质酶活性分析

研究测定了 36 种芽胞杆菌，15 种芽胞杆菌具有几丁质酶活性，其水解透明圈 *H*/*C* 值和几丁质酶活性见表 2-44。从表中可知，①不同种类的芽胞杆菌产几丁质酶的能力差异很大；②芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值为 1.71～2.40，种类间几丁质酶 *H*/*C* 值相差 1.40 倍；③芽胞杆菌几丁质酶活性为 10.23～14.85U/ml，种类间几丁质酶产生能力相差 1.45 倍；④芽胞杆菌种类间的几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值与几丁质酶活性之间无线性关系。

表 2-44　芽胞杆菌产几丁质酶活性测定

菌株编号	几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值	几丁质酶活性/（U/ml）
FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）	1.88	10.23
FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）	2.00	10.31
FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）	2.05	11.04
FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌 *B. butanolivorans*）	1.93	11.36
FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）	1.93	11.59
FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）	1.74	12.00
FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrifican*）	1.71	13.03
FJAT-10033（强壮芽胞杆菌 *B. fortis*）	1.76	13.38
FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）	1.87	13.54
FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）	2.40	14.85

五、芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-44 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-67，可以将 10 种芽胞杆菌产几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为 3 类：第 1 类，几丁质酶水解透明圈大小中等，*H*/*C* 值为 1.87～2.05，其包含了 6 种芽胞杆菌，即 FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）、FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）、FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌 *B. butanolivorans* ）、FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）。第 2 类，几丁质酶水解透明圈较小，*H/C 值*为 1.71～1.76，其包括了 3 个芽胞杆菌，即 FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrifican*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-10033（强壮芽胞杆菌 *B. fortis*）。第 3 类，几丁质酶水解透明圈较大，*H*/*C* 值达 2.40，其包含了一种芽胞杆菌，即 FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）。

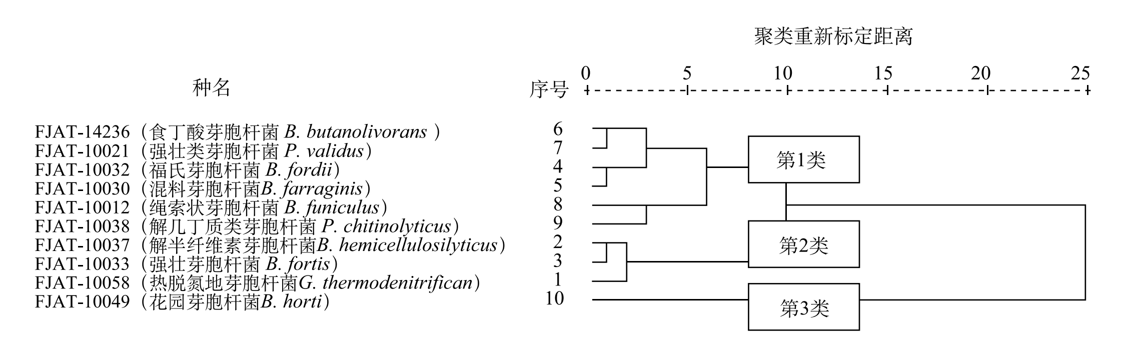


图 2-67　几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

六、芽胞杆菌几丁质酶活性聚类分析

利用表 2-44 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 10 种芽胞杆菌的几丁质酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-68。芽胞杆菌几丁质酶活性可以分为两类：第 1 类，该类芽胞杆菌几丁质酶活性较低，为 10.23～12.00U/ml，其包含了 6 种芽胞杆菌，即 FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）、FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌 *B. butanolivorans*）、FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）、FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）。第 2 类，芽胞杆菌几丁质酶活性较高，为 13.02～14.85U/ml，其包含了 4 种芽胞杆菌，即 FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrifican*）、FJAT-10033（强壮芽胞杆菌 *B. fortis*）、FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）、FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）。

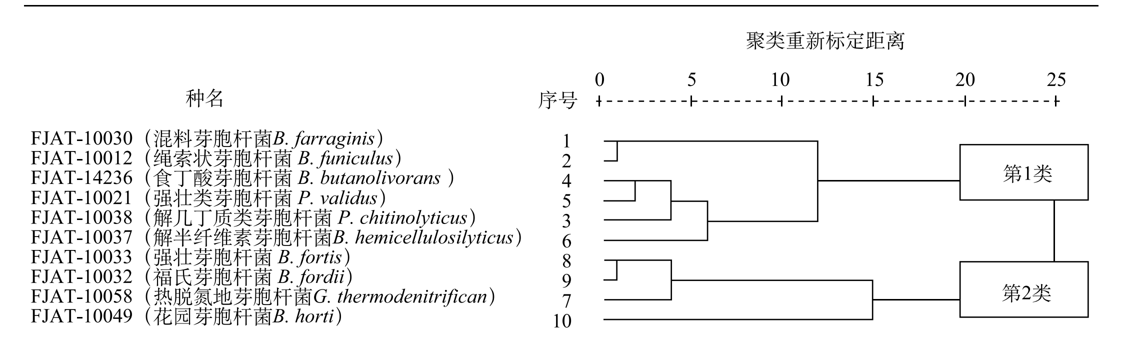


图 2-68　芽胞杆菌几丁质酶活性聚类分析

七、芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择既测定过几丁质酶水解透明圈，又测定了几丁质酶活性的 10 种芽胞杆菌，建立数据矩阵（表 2-44）。芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在着 4 种类型：①芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值大而几丁质酶活性低，如 FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）的 *H*/*C* 值较高，为 2.00，而几丁质酶活性较低，仅为 10.31U/ml；②芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而几丁质酶活性高，如 FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrifican*）的 *H*/*C* 值小，为 1.71，几丁质酶活性高，为 13.03U/ml；③芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值大同时几丁质酶活性高，如 FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）的 *H*/*C* 值大，为 2.40，几丁质酶活性高，为 14.85U/ml；④芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值小同时几丁质酶活性低，如 FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）的 *H*/*C* 值小，为 1.88，几丁质酶活性低，为 10.23U/ml。芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值和几丁质酶活性经常是不同步的，这与其生物学特性有关，作者检测的时期，也许是芽胞杆菌几丁质酶检测的最好时期，但对于几丁质酶水解透明圈的测定不是最佳时期，同样，培养条件、营养条件、菌株种类等对其都有影响。

以欧氏距离为尺度，用类平均法对 *H*/*C* 值与几丁质酶活性进行聚类分析，聚类图见图 2-69。聚类结果基于几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值与几丁质酶活性将芽胞杆菌分为 3 类：第 1 类，6 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌几丁质酶活性较低，为 10～12U/ml，几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化较大，为 1.74～2.05，包括 FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）、FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）、FJAT-14236（食丁酸芽胞杆菌 *B. butanolivorans* ）、FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）。第 2 类，3 种芽胞杆菌聚为一类，其特点是几丁质酶活性较高，为 13.0～13.5U/ml，几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值较小，为 1.71～1.87，包括 FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrifican*）、FJAT-10033（强壮芽胞杆菌 *B. fortis*）、FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）。第 3 类，一种芽胞杆菌聚成一类，其特点是几丁质酶活性较高，为 14.85U/ml，几丁质酶水解透明圈 H/C 值差异较大，为 2.4，包括 FJAT-10049（花园芽胞杆菌 *B. horti*）。

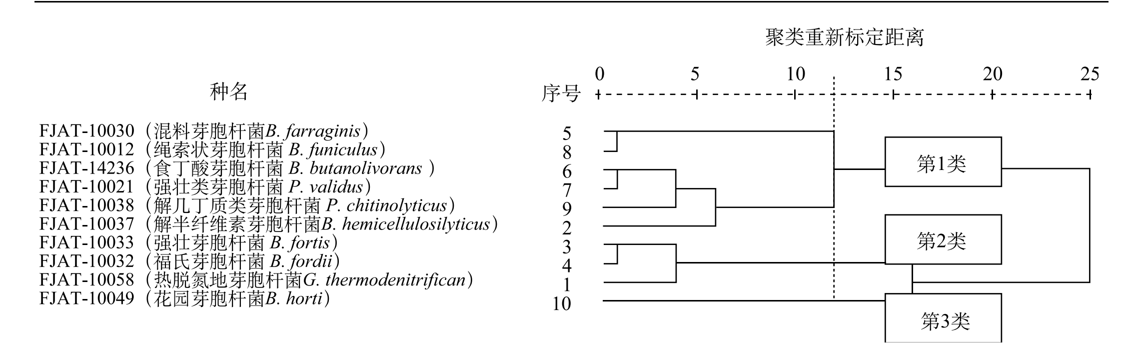


图 2-69　芽胞杆菌几丁质酶水解透明圈 *H*/*C* 值与几丁质酶活性的相互关系聚类分析

第九节　芽胞杆菌产木聚糖酶特性

一、概述

木聚糖酶在造纸行业中，如纸浆的漂白、打浆处理、废纸脱墨、改善纤维性能等方面有广泛应用。造纸行业中多采用硫酸盐法制浆，此方法的弊端是使用了大量的氯和含氯化合物（次氯酸、次氯酸钙和二氧化氯），在漂白过程中会产生大量的有毒有机氯化物，对身体和环境都造成了很大的危害，并且在一定程度上对造纸设备有一定的腐蚀作用。木聚糖酶在纸浆的漂白过程中可以把连接在纤维素和木素上的木聚糖降解，这就增加了漂白剂与木素的接触，使纸浆可以达到高效漂白的作用进而也减少了氯的用量（刘玉新等，2004）。1986 年，Viikar 等研究表明，利用木聚糖酶处理硫酸盐纸浆不仅能够减少氯的用量而且能够增强漂白的效果，对于环境保护有重要作用。后来，Wong 等（1998）利用商品木聚糖酶 Cartazymes HS 对白杨木的硫酸盐纸浆进行预处理，结果显示纸浆最终亮度达到 95%，氯用量减少了 18%。西班牙的 Miranda 造纸公司使用一种木聚糖酶 Cartazymes HS 对桉树的硫酸盐纸浆进行预漂白试验，使纸浆的亮度最终达 100%。葛培锦等（2005）研究表明，在碱法制备麦草浆时，采用木聚糖酶预处理、乙酸酐活化和 H_2O_2 漂白相结合的 XP5aP5a 漂白程序而改变之前单纯使用 H_2O_2 漂白的方法，可获得白度为 74.6% ISO 的漂白麦草生物化机浆。慕娟等（2012）研究显示，碱性木聚糖酶应用于麦草浆造纸中，不仅可以减少氯化物用量的 20%而且还可以提高纸张的质量，提高纸浆白度 3%～6%。陈艳希等（2013）的研究使氯化物的用量减少到 31%。国内学者研究过 11 种芽胞杆菌产木聚糖酶特性，综述如下。

（1）短小芽胞杆菌（*B. purnilus*）

研究了不同营养条件下短小芽胞杆菌 WL-11 产蛋白酶和木聚糖酶的情况。结果表明，碳源对菌株 WL-11 木聚糖酶的合成具有诱导或抑制作用，对其蛋白酶的合成影响并不显著；氮源对菌株 WL-11 木聚糖酶的合成不具有直接的调节作用，而可能通过调节其蛋白酶的合成量来间接影响其木聚糖酶的合成（许正宏和陶文沂，2006）。对一株 *B. pumilus* WL-11 木聚糖酶的纯化、酶学性质及其底物降解模式进行了研究。经过硫酸铵盐析、CM-Sephadex 及 Sephadex G-75 层析分离纯化，获得一种纯化的菌株 WL-11 木聚糖酶 A，

其分子质量为 26.0kDa，pI9.5，以燕麦木聚糖为底物时的表观 K_m 值为 16.6mg/ml，v_{max} 值为 1263μmol/（min·mg）。木聚糖酶 A 的 pH 为 6.0～10.4，最适作用 pH 为 7.2～8.0，是耐碱性木聚糖酶；最适作用温度为 45～55℃，在 37℃、45℃以下时该酶热稳定性均较好；50℃保温时，该酶活性的半衰期大约为 2h，在超过 50℃的环境下，该酶的热稳定较差，55℃和 60℃时的酶活半衰期分别为 35min 和 15min。菌株 WL-11 木聚糖酶 A 对来源于燕麦、桦木和榉木的可溶性木聚糖的酶解结果发现，木聚糖酶 A 对几种不同来源的木聚糖的降解过程并不一致，HPLC 法分析上述底物的降解产物生成过程发现木聚糖酶 A 为内切型木聚糖酶，不同底物的降解产物中都无单糖的积累，且三糖的积累量都较高；与禾本科的燕麦木聚糖底物降解不同的是，木聚糖酶 A 对硬木木聚糖降解形成的五糖的继续降解能力较强。LC 法分析了菌株 WL-11 粗木聚糖酶降解燕麦木聚糖的过程，结果表明燕麦木聚糖能够被菌株 WL-11 粗木聚糖酶降解生成系列木寡糖，未检出木糖，这说明菌株 WL-11 主要合成内切型木聚糖酶 A，同时发酵液中不含木糖苷酶，适合用来酶法制备低聚木糖（许正宏和陶文沂，2005）。从青海盐碱湖土壤中筛选到 25 株产碱性木聚糖酶的菌株，其中编号为 QH14 的菌株产酶量达 648.79U/ml，纯化后比活可达 1148.56U/mg。16S rDNA 鉴定表明，菌株 QH14 属于短小芽胞杆菌，命名为 *Bacillus* sp. QH14。从该菌株的基因组中克隆获得了碱性木聚糖酶编码基因 *XynQH14*，并在大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3）中获得重组表达。通过镍离子金属螯合亲和层析（Ni-NTA 亲和层析）分离纯化后的重组 QH14 木聚糖酶比活达 700.47U/mg。该碱性木聚糖酶的酶促反应最适温度为 60℃，最适 pH 为 9.2；55℃处理 1h 仍保持 50%的活力；在 pH7.0～11 条件下 37℃处理酶液 24h 后均保持 80%以上的活力，且在 pH11 缓冲溶液中 50℃处理 24h 仍保持 31.02%的酶活，显示了该碱性木聚糖酶较好的热稳定性和碱稳定性，提示该碱性木聚糖酶在制浆造纸、纺织等行业的应用潜力（单志琼等，2012；陈士成和曲音波，2000a）。采用 PCR 方法对短小芽胞杆菌 A-30 的耐碱性木聚糖酶基因进行克隆。在木聚糖选择平板上用刚果红染色法筛选出阳性克隆，提取阳性克隆的重组质粒进行酶切鉴定和测序。该基因在大肠杆菌中表达，过夜培养物胞外、胞内和周质空间的木聚糖酶酶活分别为 0.159IU/ml、0.322IU/ml、0.007IU/ml。此木聚糖酶表现出较宽的 pH 作用范围，最适作用 pH7 左右，在 pH9 时仍有 60%以上的酶活性（刘相梅和祁蒙，2001）。从短小芽胞杆菌 BP51 中克隆得到木聚糖酶基因 *xynA*。将其构建在大肠杆菌表达载体 pET21a 上，转化 *E. coli* BL21，获得重组工程菌 BLX5。经 IPTG 诱导，*xynA* 基因的表达产物以胞内可溶性蛋白和包涵体形式存在。重组表达木聚糖酶的活力可达 165.511U/ml 培养物。重组表达的木聚糖酶最适温度为 55℃，最适 pH 为 6.5，在碱性条件下具有良好的稳定性，降解产物以三糖、四糖和五糖为主（刘伟丰等，2004）。采用单因素试验和正交试验的方法研究了短小芽胞杆菌固态发酵生产木聚糖酶的培养条件，确定了利用麸皮作为主要基质进行固态发酵生产木聚糖酶的适宜条件：pH9、温度 35℃、料液比 1∶2、接种量 10%。在 500ml 三角瓶中固态培养 72h 左右，木聚糖酶的活力可达 4915U/g 干曲（程显好等，2009）。克隆并测序来源于短小芽胞杆菌的木聚糖酶基因，测定其编码产物的理化性质并鉴定其表达产物为常温酶蛋白；利用同源建模构建出具有较高精度的三级结构模型，并进行优化和评估；利用分子动力学模拟木聚糖酶基因对热不稳定的分子机制，了解影响该酶热稳定性的因素，寻找对热不稳定性的区域。通过与嗜热木聚糖酶比较

发现，两者在 3 个区域的分子动力学行为存在较明显的差异（葛慧华等，2011）。将短小芽胞杆菌 HB030 的内切-1,4-木聚糖酶基因克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上，得到重组质粒 pH-BM220，将 pHBM220 经酶切后分别转化 3 株毕赤酵母菌株 KM71、GS115、SMD1168，该木聚糖酶基因在 3 株毕赤酵母中均实现了分泌表达，将重组毕赤酵母菌株 KM71（pHBM220）、GS115（pHBM220）、SMD1168（pHBM220）分别诱导产酶，对重组酶进行相关的酶学性质分析表明，三者的最适反应 pH 约为 5.5，最适反应温度约为 60℃，在其最适反应条件下测得三者粗酶液酶活分别为 10.80IU/ml、11.63IU/ml、9.68IU/ml，重组毕赤酵母菌株 KM71（pHBM220）所产酶的热稳定性较好，而在 pH 稳定性方面三者没有太大的差异（汪正兵和宋慧婷，2003）。克隆测序短小芽胞杆菌木聚糖酶基因，在同源建模所得三维结构的基础上寻找底物结合可能的活性口袋，用计算机模拟其与底物木聚糖的对接，预测酶与催化反应过程的关键氨基酸残基。所得的信息对木聚糖酶的定向改造有重要意义（林锦霞等，2007）。从碱性土样中分离到数十株产碱性 β-聚糖酶类的细菌，经摇瓶反复筛选后，得到一株碱性 β-聚糖酶产量较高的耐碱细菌，经初步鉴定属短小芽胞杆菌，其纤维素酶作用的最适 pH 为 7.6，最适温度为 60℃，木聚糖酶的作用最适 pH 为 9.0，最适温度为 55℃，该菌的最适生长 pH 为 8.0，最适产酶温度为 28～32℃，木聚糖与山梨糖分别是木聚糖酶和纤维素酶的良好诱导物，以麸皮为碳源，产酶的最适浓度为 5%，添加尿素和（NH_4）$_2SO_4$ 为氮源可提高纤维素酶酶活 2 倍，木聚糖酶酶活 1 倍，发酵周期为 60h，纤维素酶酶活最高可达 1.21IU/ml，木聚糖酶酶活可达 43IU/ml（姜英辉和曲音波，1999）。用响应面法对短小芽胞杆菌 XY1432 液体发酵生产木聚糖酶的培养条件进行了优化，首先用单因素试验，选出最佳的碳源为玉米芯+麸皮，氮源为碳酸铵，pH 为 8；然后用 Plackett-Burman 设计对 12 个相关影响因素进行了评价，选出 3 个主要的影响因素碳源、硫酸镁和磷酸二氢钾进行最陡爬坡试验，逼近最大产酶区域；最后用响应面法分析确定了主要影响因素的最佳条件，使酶活性由 638IU 提高到 1882IU（崔月明等，2008）。从 34 株细菌中筛选到一株木聚糖酶高产菌株 *B. pumilus* H-101，适宜的产酶培养基含 2.0%小麦秸半纤维素、0.2%（NH_4）$_2SO_4$、0.1% NH_4NO_3、0.1% K_2HPO_4、0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.02% NaCl、0.02% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 和 1.0%的酵母膏。在上述培养基中，32℃振荡培养 48h，总半纤维素酶活性达 235.6U/ml，木聚糖酶活性达 1164U/ml（孙迅和王宜磊，1997）。采用刚果红法从碱性土壤中筛选到木聚糖酶高产菌株 BP51，通过培养特性及 16S rDNA 序列分析，初步鉴定为短小芽胞杆菌；经产酶发酵条件的优化，即 4%麸皮、1%麸皮半纤维素、0.5%（NH_4）$_2SO_4$，pH8.0，37℃培养 72h，产酶活性达 553.4IU/ml；该酶作用最适温度为 55℃，最适 pH6.5，在 pH9.0 的条件下仍具有 60%的酶活性，pH11.0 保温 30min 仍具有 40%的酶活性；将粗酶液用于麦草浆的漂白中，结果表明氯的用量明显降低，白度却提高了 20%以上（包怡红等，2005）。从木聚糖酶高产短小芽胞杆菌 BP51 中克隆得到木聚糖酶基因 *xynA*，将其构建在芽胞杆菌表达载体 pWH1520 中得到重组质粒 pWSX11。*xynA* 由木糖诱导 xylA 启动子调控 *xynA* 表达。采用同源高效表达策略，以原生质体转化方法将 pWSX11 转回原始菌株 BP51 中，获得重组菌株 BPX11。通过木糖诱导重组菌株中的 *xynA* 以基因高效分泌表达，使木聚糖酶产酶活性比原菌株 BP51 提高了 87%，同时对重组表达的木聚糖酶的酶学性质进行了初步研究（刘伟丰等，2004）。从石油污染严重地区的贫瘠土壤中筛选得

到的一株高产木聚糖酶且能够耐受一定浓度乙醇的细菌，经生理生化实验及 16S rDNA 鉴定为短小芽胞杆菌，命名为 DT83。对其产木聚糖酶的发酵条件进行优化，结果表明：最适碳源为木聚糖，最适氮源为蛋白胨，产酶最适温度为28℃，最佳初始pH为8.5。SDS-PAGE 分析表明，木聚糖酶分子质量约为 23kDa。DT83 和 *E. coli* BL21 的乙醇耐受实验结果比较表明，菌株 DT83 具有较高乙醇耐受度，可达 8%～10%（刘多涛等，2010）。以实验室自行分离筛选出的产木聚糖酶短小芽胞杆菌 HZ-01 的基因组 DNA 为模板，采用 PCR 方法扩增得到一条含有木聚糖酶基因的 DNA 片段，对其进行序列比对及生物信息学分析，结果表明，该基因全长为 687bp，编码 228 个氨基酸，理论分子质量约为 25kDa，存在 4 个潜在的 *N*-糖基化位点，密码子使用存在偏爱性（韩学易等，2013）。以短小芽胞杆菌 HJ-04 为初发菌株，通过紫外诱变的方法筛选得到一株木聚糖酶高产菌株 B-6，其酶活提高约 30%。通过因素轮换试验和 $L_9(3^4)$正交试验结果得出菌株 B-6 产酶的最佳营养条件及发酵条件，4%啤酒糟、2%玉米芯、2%牛肉膏、0.15% $FeSO_4$、1.5% Na_2HPO_4，pH8～9，35℃，170r/min 培养 60h，产酶活性达 536.72IU/ml（周欣等，2009）。

（2）短短芽胞杆菌（*B. brevis*）

根据已发表的环状芽胞杆菌（*B. circulans*）和枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）木聚糖酶基因序列设计引物，首次扩增出短芽胞杆菌中的 β-1,4-内切木聚糖酶（以下简称木聚糖酶，E.C.3.2.1.8）基因片段。序列分析表明，该基因与已登录的木聚糖酶基因 AF490979.1 和 AF490980.1 分别有 97%和 96%的同源性，与其他芽胞杆菌属的同源性也较高。将此基因片段插入表达载体 pET-30a（+）构建重组质粒。重组基因工程菌破碎后进行 SDS-PAGE 检测，结果表明，IPTG 诱导后，木聚糖酶基因在大肠杆菌的胞内获得高效表达，且酶活性最高可达 26.14U/ml。重组木聚糖酶最适温度为 50℃，最适 pH 为 9.0（胡春霞等，2009）。

（3）多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）

β-1,4-木聚糖酶和 β-1,3-1,4-葡聚糖酶活性检测结果表明，多粘类芽胞杆菌 SC2 能同时产生 β-1,4-木聚糖酶和 β-1,3-1,4-葡聚糖酶。以菌株 SC2 的基因组 DNA 为模板，通过 TAIL-PCR 方法克隆到 4807bp 的 DNA 片段。DNAMAN 软件分析，该 DNA 片段包含两个可读框（ORF），ORF1 长度为 1908bp，编码含 635 个氨基酸、分子质量为 67.8kDa 的蛋白质；ORF2 长度为 714bp，编码含 237 个氨基酸、分子质量为 26.8kDa 的蛋白质。Blast 分析结果表明，ORF1 与已报道的 *P. polymyxa* ATCC842 的 *xynD* 基因相似性为 94%，ORF2 与 *P. polymyxa* Y110 的 *gluB* 基因相似性为 99%。基因序列的系统发育分析进一步说明，ORF1 和 ORF2 分别为 β-1,4-木聚糖酶基因 *xynD* 和 β-1,3-1,4-葡聚糖酶基因 *gluB*（朱辉等，2008）。

（4）蜂房类芽胞杆菌（*P. alvei*）

优化了蜂房类芽胞杆菌利用蔗渣发酵产木聚糖酶的工艺条件，并考察木聚糖酶发酵的动力学过程，结果表明在优化工艺条件下发酵 45h，蜂房类芽胞杆菌产木聚糖酶活性最高可达 7447IU/ml，比优化前提高 94%（夏剑辉和王水兴，2003）。实验研究了温度、pH 和 Al^{3+}、Zn^{2+}、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{3+}及 Cu^{2+}等几种常见金属离子对蜂房类芽胞杆菌木聚糖酶活性的影响，结果表明该酶最适温度为 40℃，最适 pH 为 6.0，在低温及

pH7.0～9.0 条件下，该酶活性稳定；Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}对木聚糖酶有激活作用，Cu^{2+}、Al^{3+}、Zn^{2+}和 Fe^{3+}对木聚糖酶有抑制作用，Cu^{2+}的抑制作用最强（黄运红等，2003）。从土壤中筛选出一株产纤维素酶的蜂房类芽胞杆菌，利用甘蔗渣固态发酵生产木聚糖酶。最佳的固态发酵条件为：酵母膏 0.2%、麸皮 20%、蔗渣 80%，加入其干重 4 倍的水，发酵温度为 32℃，pH 为 8.5，最大酶活可达 1213U/g（吴凌伟等，2003）。

（5）环状芽胞杆菌（*B. circulans*）

为探明环状芽胞杆菌果胶酶及木聚糖酶的催化特性，更好地发挥它们的催化性能，从 pH、温度、底物浓度、反应时间、离子浓度几个方面研究了环状芽胞杆菌 A6 中果胶酶与木聚糖酶活性测定的最适方法。结果表明，果胶酶活性测定的最适条件是：0.5%的果胶溶液用 pH10.5 的 0.2mol/L 甘氨酸、氢氧化钠缓冲液配制，测定温度 45℃，酶反应时间 5min。木聚糖酶活性测定的最适条件是：0.8%的木聚糖溶液用 pH7.0 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液配制，测定温度 55℃，酶反应时间 10min（李立恒等，2005）。为了克服传统沤麻工艺的不足，提高沤麻的效率，以亚麻原茎为菌种筛选来源，通过初筛、复筛得到了一株产果胶酶和木聚糖酶活性较高，不产纤维素酶的脱胶菌株 A6。摇瓶脱胶试验表明，菌株 A6 24h 完成亚麻脱胶，脱胶后纤维残胶率为 20.63%，胶质脱除率达 38.80%，比天然水脱胶高出 11%，初步鉴定并命名为环状芽胞杆菌 A6（黄小龙等，2004）。

（6）耐盐芽胞杆菌（*B. halodurans*）

筛选到一株高产 β-1,4-聚糖酶芽胞杆菌 A-30，采用麸皮为主要碳源，尿素为主要氮源，在 pH8.5、温度 32℃发酵 60h，最高木聚糖酶酶活可达 460IU/ml，纤维素酶酶活最高可以达 1.21IU/ml。Fe^{3+}、Fe^{2+}、Al^{3+}可以促进纤维素酶的合成，而 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Hg^{2+}则起抑制作用。多数氨基酸可以在很大程度上促进 β-1,4-聚糖酶的合成，在 15L 发酵罐进行放大，使发酵周期提前了 30h，并且木聚糖酶酶活比摇瓶发酵提高了 1.5 倍（陈士成等，2000）。

（7）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

采用活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合，从枯草芽胞杆菌固体培养基发酵产物中分离得到了两种木聚糖酶。薄层色谱和高压液相色谱分析结果进一步表明它们具有内切木聚糖酶的活力，分别定义为 xylⅠ和 xylⅡ，两种酶具有相同的最适反应温度（50℃）和最适 pH（7.0）。另外，还研究了内切木聚糖酶 xylⅡ对小麦麸皮不溶性膳食纤维的作用，纸色谱分析结果表明，酶解产物中含有阿魏酰低聚糖（袁小平等，2005）。针对玉米芯微波消解-内切木聚糖酶水解制备低聚木糖的工艺，以低聚木糖的得率为主体评价指标，通过单因素试验对影响低聚木糖得率的微波消解过程和内切木聚糖酶水解过程的因素与水平进行研究，并考察获得的低聚木糖对益生菌的体外增殖作用。结果表明：玉米芯酶法制备低聚木糖最佳，微波处理时间 5min，内切木聚糖酶用量 140U/g，酶解时间 6h；在最适条件下，玉米芯酶解液中低聚木糖的得率为 82.5%，质量浓度为 11.02g/L；低聚木糖对益生菌的体外增殖实验表明，低聚木糖添加量在 0.2%和 0.4%时，分别可以对乳酸杆菌和枯草芽胞杆菌起到最好的增殖作用，分别达 311%和 183%，添加量进一步提高反而会抑制这两种菌的生长（李艳丽等，2011）。为了在枯草芽胞杆菌中整合表达极端耐热木聚糖酶，将嗜热网球菌（*Dictyoglomus thermophilum*）菌株 Rt46B.1 的极端耐热木聚糖酶基因 *xynB*

通过穿梭载体 pDL 整合到 *B. subtilis* 168 染色体上，使其实现表达。极端耐热木聚糖基因在枯草芽胞杆菌中成功整合并表达。基因工程菌 *B. subtilis* 168-xynB 能外泌表达极端耐热木聚糖酶，且表达水平为 0.7321U/ml，比在大肠杆菌中高。酶学性质表明，此酶分子质量约为 24kDa，其最适反应温度为 85℃，最适反应 pH 为 6.5，且在弱碱性条件下稳定（张伟等，2010）。从腐烂苎麻周围土壤中经过初筛和复筛得到具有脱胶能力的枯草芽胞杆菌 B10。采用 PCR 方法对菌株 B10 的木聚糖酶基因进行克隆。在木聚糖选择平板上用刚果红染色法筛选出阳性克隆，对阳性克隆的重组质粒进行鉴定和测序，结果表明，该木聚糖酶基因全长 642 个碱基，编码 214 个氨基酸，该基因在大肠杆菌中表达。过夜培养物中胞外、胞内和胞质间的酶活分别为 22.7%、28.2%和 49.1%，该木聚糖酶的最适作用 pH 为 6，最适作用温度为 50℃，具有较宽 pH 范围和较好的热稳定性（黄俊丽等，2006）。木聚糖酶是主要工业用酶制剂之一，在食品行业应用广泛。将编码枯草芽胞杆菌（*B. subtilis* B2）木聚糖酶 XYN 的基因克隆到 pPIC9K 载体中，构建了分泌型表达载体 pPIC9K-XYN，载体经线性化后转化 *Pichia pastoris* GS115，筛选获得了分泌表达 XYN 的重组毕赤酵母工程菌 GS115/pPIC9K-XYN。初步研究表明：以山毛榉木聚糖为底物时，重组毕赤酵母工程菌摇瓶水平发酵上清液中木聚糖酶酶活可达 1542.6U/ml，重组木聚糖酶最适温度为 50℃，最适 pH 为 6.0，并显示出较好的热稳定性和宽 pH 适应性（韩双艳等，2009）。通过测定枯草芽胞杆菌 CS16 的抑菌活性，对其胞外代谢物活性与成分进行分析，以期开发有效的生防菌剂。结果表明：菌株 CS16 对多株植物病原真菌具有明显的抑制作用，对病原细菌的抑菌作用相对较弱，CS16 发酵液中羧甲基纤维素酶、淀粉酶和木聚糖酶活性分别为 509.58U/ml、7198.71U/ml 和 1853.68U/ml；其发酵液经酸沉淀所得粗提物可明显抑制香蕉枯萎病菌丝生长，最小抑菌浓度为 0.0625mg/ml。利用反相硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱和正相硅胶柱分离纯化获得较纯的抑菌物质，经薄层层析和液相色谱定性分析，初步认为其胞外抑菌物质中含有伊枯草菌 A（Iturin A）（李占飞等，2013）。基于 Logistic 和 Leudeking-Piret 方程，根据分批发酵过程中菌体生长、产物积累、总糖消耗、还原糖消耗及反应体系 pH 的变化规律构建枯草芽胞杆菌 E79 发酵过程中菌体细胞生长、产物合成及基质消耗的动力学模型，应用 SPSS11.5 软件对数据进行计算与分析，Oirgin7.5 软件经非线性拟合与优化，获得了最佳模型参数值。结果表明：所构建的数学模型计算值与实验数据拟合良好，拟合模型 R^2 均大于 0.99，较好地反映了菌株 E79 发酵过程中菌体细胞生长、基质消耗和木聚糖酶合成的动力学特征。枯草芽胞杆菌 E79 分批发酵过程中产物的合成属于生长偶联型（聂国兴等，2011）。对从土壤中筛选到的一株枯草芽胞杆菌 XY1905 木聚糖酶的酶学性质进行了初步研究，结果表明：木聚糖酶测定的最佳条件是 pH 为 6，反应时间 10min，反应温度 60℃；热稳定性很强，在 80℃条件下保温 1h，剩余酶活 96.44%；对金属离子不敏感（崔月明等，2005）。通过单因素和正交试验，对芽胞杆菌产木聚糖酶的发酵条件进行了研究，结果显示最佳产酶条件是：2%麸皮、0.5%（NH_4）$_2HPO_4$、0.1% K_2HPO_4、0.02% $MgSO_4 \cdot 2H_2O$、0.2%吐温 80、1mmol/L 微量元素（Fe^{2+}、Zn^{2+}）、pH9.0，35℃，振荡培养 48h，其木聚糖酶活性可达 2.67IU/ml（黄国勇和吴振强，2006）。建立了一种快速、简便分离纯化木聚糖酶的方法，采用活性聚丙烯酰胺凝胶电泳和均质提取法相结合，从枯草芽胞杆菌固态培养基发酵产物中分离得到了两种内切木聚糖酶，分别定义为

xylⅠ和 xylⅡ，它们水解桦木木聚糖的主要产物有木二糖、木三糖和聚合度更高的木聚寡糖，没有木糖。SDS-PAGE 显示内切木聚糖酶 xylⅡ为单肽链结构，分子质量为 98.8ku。内切木聚糖酶 xylⅡ的酶反应最适温度为 50℃，酶反应的最适 pH 为 7.0。Mn^{2+}对 xylⅡ酶反应具有促进作用，将酶活提高了 2.7 倍，而 Fe^{3+}对该酶反应起完全抑制作用（袁小平等，2004）。构建枯草芽胞杆菌信号肽筛选载体并用菌体自身信号肽引导表达外源木聚糖酶基因，为枯草芽胞杆菌木聚糖酶高效分泌表达系统的建立奠定基础。利用基因工程的原理和方法，将壮观霉素抗性基因（*spec*）与短小芽胞杆菌的木聚糖酶基因（*xynA*）克隆到大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭表达载体 GJ148 上，构建枯草芽胞杆菌信号肽筛选载体 pYG，将枯草芽胞杆菌信号肽 Epr 克隆到已构建载体上，以枯草芽胞杆菌 WB700 为表达宿主，引导木聚糖酶基因进行表达。最终成功构建枯草芽胞杆菌信号肽筛选载体 pYG，将枯草芽胞杆菌信号肽 Epr 克隆到 pYG 上，在 WB700 中引导并表达木聚糖酶基因。在克隆入信号肽后可成功表达木聚糖酶基因，为信号肽的系统性筛选和木聚糖酶高效表达提供依据（段春燕等，2011）。研究耐碱性短小芽胞杆菌木聚糖酶在枯草芽胞杆菌中异源表达。从耐碱性木聚糖酶高产短小芽胞杆菌 BYG5-20 中克隆得到带有自身启动子的木聚糖酶基因 *xynA*，将其构建在大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭载体 pGJ148 中得到重组质粒 pGJ148-xynA。采用电转化法将重组质粒 pGJ148-xynA 转入枯草芽胞杆菌 A747 中，得到重组菌 GJ148-xynA，然后进行诱导表达以及培养基的优化。重组菌 GJ148-xynA 发酵上清液中木聚糖酶酶活可达 93.32IU/ml。耐碱性短小芽胞杆菌木聚糖酶基因 *xynA* 可以在枯草芽胞杆菌中实现异源表达，为枯草芽胞杆菌木聚糖酶分泌表达系统的进一步优化奠定了基础（周煌凯等，2010）。外源酶是提高反刍动物饲料利用率的一种新型饲料添加剂。酶是微生物发酵的产物，酶制剂的生产过程其实是一个发酵过程。反刍动物饲料酶制剂来自真菌（主要是长柄木霉、黑曲霉、米曲霉）和细菌（主要是枯草芽胞杆菌）。目前市场上的外源酶添加剂可分为两大类：一类是较纯的酶制剂，是经浓缩和纯化的，含有特定的酶，并有一定的活性，通常不含活细胞，如纤维素酶和木聚糖酶；另一类是粗发酵品和一些非细菌的直接饲喂的微生物（DFM），含有一定量的酶（刘芳和潘晓亮，2006）。克隆含有信号肽碱性木聚糖酶基因（*xynA*）片段与依赖转录起始因子 σB 的启动子 PgsiB 片段，将其克隆至实验室前期构建的大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭载体上，并转化入枯草芽胞杆菌 WB700 菌株，获得重组菌 BXS-W。当细菌生长至对数期中期时，施加不同的应激处理，采用 DNS 法测定木聚糖酶活性 xynA 与 PgsiB 片段；成功构建表达载体 pBXS，并获得重组菌株 BXS-W；应激试验表明，施加的 5 种应激条件均极显著提高（$P<0.01$）木聚糖酶基因的表达量，其中以乙醇应激效果最好（曹鹏涛等，2012）。以枯草芽胞杆菌和蜡状芽胞杆菌为初发菌株，采用紫外诱变的方法获得了两株木聚糖酶高产菌株，酶活分别是原来的 17.50 倍和 17.20 倍，选取酶活最高的菌株进行发酵条件的研究（胡源媛等，2006）。

（8）蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）

以黑曲霉、蜡状芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌为初发菌株，采用紫外物理诱变及紫外物理诱变和紫外亚硝酸复合诱变的方法，选育培养出产木聚糖酶酶活较高的菌株。经过紫外诱变后黑曲霉菌株所产酶酶活为 17.3716U/ml；经过复合诱变后黑曲霉菌株所产酶酶活为 15.2144U/ml。经过紫外诱变后枯草芽胞杆菌和蜡状芽胞杆菌所产木聚糖酶酶活分别为

16.1328U/ml 和 13.7200U/ml（陈凤莲，2012）。以枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）和蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）为初发菌株，采用紫外诱变的方法获得了 2 株木聚糖酶高产菌株，酶活分别是原来的 17.50 倍和 17.20 倍。选取酶活最高的菌株进行发酵条件的研究（胡源媛等，2006）。

（9）多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）

以木聚糖为唯一碳源，从富含半纤维素的土壤中分离纯化出 115 株产木聚糖酶的菌株，以 DNS 法从中筛选出一株木聚糖酶酶活最高的细菌，经 16S rDNA 鉴定其为类芽胞杆菌。经单因素试验和正交设计试验，得出该菌株的最佳产酶培养基为：玉米芯木聚糖 30.0g/L、胰蛋白胨 6.0g/L、K_2HPO_4 5.0g/L、吐温 803.0g/L。用此配方对菌株进行摇瓶培养，最佳培养条件为：初始 pH=7.0、温度 32℃、摇床转数 220r/min，在此条件下培养 96h，发酵液中木聚糖酶活性达 194.67IU，是未经优化的基础产酶培养条件产酶能力的 1.58 倍（包怡红等，2008）。

（10）嗜碱芽胞杆菌（*B. alcalophilus*）

采用水解圈法筛选到一株产碱性木聚糖酶的嗜碱芽胞杆菌 NT-16，该菌株产酶的最佳碳源和氮源分别是木糖和胰蛋白胨，其优化的产酶条件为：半纤维素 2%、胰蛋白胨 1%、Tween-80 0.1%、K_2HPO_4 0.1%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.02%、pH10.0，200r/min，72h，37℃，该菌株产生的木聚糖酶的最适 pH 为 9.0（税欣和郑连爽，2007）。利用透明圈法筛选到一株产木聚糖酶的嗜碱芽胞杆菌 NT-9，该菌株产木聚糖酶为组成型，正交设计试验结果表明，合适的产酶条件为：木糖 15.0g/L、硫酸铵 2.5g/L、Tween-80 2.0g/L、K_2HPO_4 1.0g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.2g/L，pH10.0，37℃，200r/min，振荡培养 72h，其木聚糖酶活性可达 6.36IU/ml（韩晓芳等，2002）。采用嗜碱芽胞杆菌 NT-9 产生的木聚糖酶对苇浆进行生物漂白预处理，并分析了酶处理苇浆的理化性能。结果表明，在酶剂量 5～25IU/g 样品、50℃、pH8.6 条件下处理 120min，苇浆失重率随酶剂量的增加而上升，苇浆的白度也有一定提高。X 射线衍射分析显示，酶处理苇浆纤维的相对结晶度降低了 2.43%，扫描电镜也证实酶处理苇浆纤维表面形貌发生了一些明显的变化（韩晓芳和郑连爽，2004）。

（11）嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌（*G. stearothermophilus*）

来自嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌的木聚糖内切酶 *XT6* 在工业上有着重要的应用，已经成功应用于工业规模的生产试验。作者在合成 *XT6* 基因全序列的同时对其密码子进行了优化，且构建重组质粒在大肠杆菌中高表达。通过优化表达条件，功能正常的 *XT6* 基因在大肠杆菌中成功过量表达，蛋白质表达量占细胞中总蛋白的 65%。重组表达的木聚糖内切酶 XT6 特性和天然酶相似，以桦木木聚糖为底物测定细胞提取物中木聚糖酶活性，最大活性高达 3030U/ml，首次报道了来自嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌中木聚糖酶基因全序列的合成和在大肠杆菌中成功过量表达（张志刚等，2009）。

二、碳源对芽胞杆菌产木聚糖酶的影响

以木聚糖酶液体发酵培养基为基础培养基，改变碳源的种类（表 2-45），含量均为 5.0g/L，摇瓶培养 36h，测定酶活。选出最佳碳源，在不同浓度（3g/L、5g/L、7g/L、9g/L、11g/L）下，摇瓶培养 36h，测定酶活。在选择最佳碳源种类的基础上选择最适浓度，然

后改变底物浓度（2g/L、5g/L、8g/L、11g/L、14g/L），摇瓶培养 36h，测定酶活。

表 2-45　碳源种类及木聚糖浓度

项目	碳源				
	麦芽糖	蔗糖	葡萄糖	玉米淀粉	酵母粉
木聚糖浓度/（g/L）	2	5	8	11	14

以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，由表 2-46 可知，不同碳源情况下，*B. safensis* FJAT-14260 产木聚糖酶能力。*B. safensis* FJAT-14260 在发酵培养基中以蔗糖和玉米淀粉为碳源时，木聚糖酶酶活很低，为 520.24U/ml；以葡萄糖、蔗糖和麦芽糖为碳源时，木聚糖酶活也处于很低的水平，分别为 40.31U/ml、125.37U/ml、776.32U/ml；以酵母粉为碳源时，菌株的木聚糖酶活性很高，可达 28 285.25U/ml，因此判定该菌株的最适碳源为酵母粉。

表 2-46　不同碳源种类对木聚糖酶酶活（U/ml）的影响

碳源	酶活一	酶活二	酶活三	木聚糖酶酶活	标准偏差
酵母粉	26 754.34	29 381.48	28 719.92	28 285.25	1366.45
麦芽糖	689.32	793.21	846.42	776.32	79.90
蔗糖	118.23	136.37	121.50	125.37	9.67
葡萄糖	29.99	39.42	51.52	40.31	10.79
玉米淀粉	494.63	518.47	547.63	520.24	26.55

酵母粉浓度对木聚糖酶活性的影响见图 2-70。酵母粉浓度为 3～9g/L 时木聚糖酶活性逐渐增加，浓度达 9g/L 时木聚糖酶活性最大，达 47 167.40U/ml，大于 9g/L 时木聚糖酶活性开始下降，由此可以得出在单因素改变的情况下酵母粉浓度为 9g/L 时木聚糖酶活性最高。

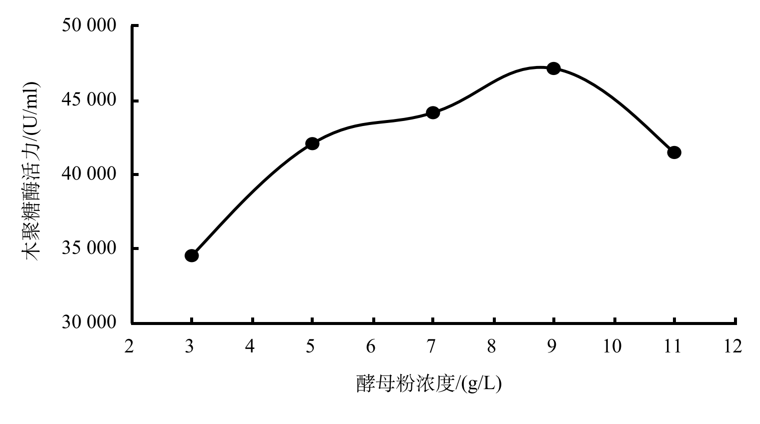


图 2-70　酵母粉浓度对木聚糖酶酶活的影响

三、氮源对芽胞杆菌产木聚糖酶的影响

以木聚糖酶液体发酵培养基为基础培养基，改变氮源的种类（表 2-47），含量均为 5.0g/L，摇瓶培养 36h，测定酶活。选出最佳氮源，在不同浓度（3g/L、5g/L、7g/L、9g/L、11g/L）下，摇瓶培养 36h，测定酶活。在选择最佳氮源种类的基础上选择最适浓度，然后改变底物浓度 （2g/L、5g/L、8g/L、11g/L、14g/L），摇瓶培养 36h，测定酶活。

表 2-47　氮源种类及木聚糖浓度

项目	氮源				
	蛋白胨	$(NH_4)_2SO_4$	牛肉膏	尿素	NH_4NO_3
木聚糖浓度/（g/L）	2	5	8	11	14

以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，由图 2-71 可知，在不同氮源情况下，*B. safensis* FJAT-14260 产木聚糖酶能力。*B. safensis* FJAT-14260 在发酵培养基中以尿素、NH_4NO_3、$(NH_4)_2SO_4$ 为氮源时，木聚糖酶酶活很低，分别为 28 808.74U/ml、28 285.25U/ml、26 927.42U/ml；以牛肉膏为碳源时，木聚糖酶酶活为 34 894.41U/ml；以蛋白胨为碳源时，菌株的木聚糖酶活性很高，可达 39 601.11U/ml，因此判定该菌株的最适氮源为蛋白胨。牛肉膏和蛋白胨属于有机氮，硝酸铵、硫酸铵、尿素属于无机氮，本实验表明使用有机氮木聚糖酶酶活比使用无机氮有很大的优势，因为有机氮成分复杂，能够为微生物的生长提供更加丰富的营养物质。

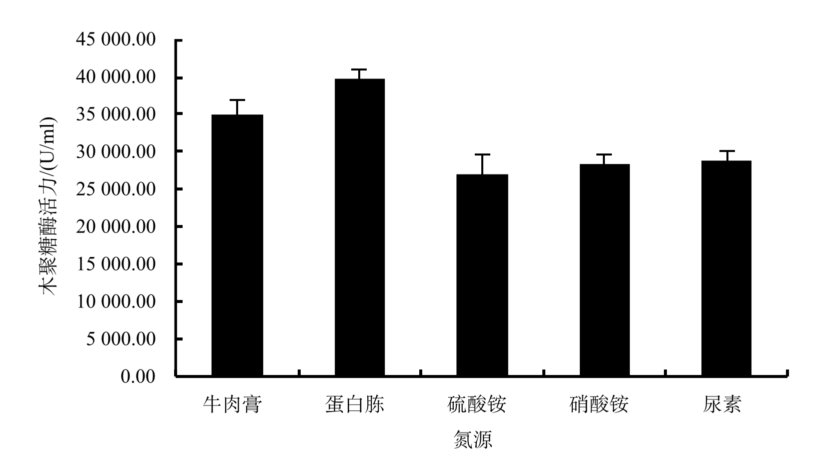


图 2-71　不同氮源对木聚糖酶酶活的影响

不同浓度的蛋白胨对木聚糖酶酶活的影响如图 2-72 所示：蛋白胨浓度为 3～7g/L 时木聚糖酶活逐渐增加，浓度达 7g/L 时木聚糖酶酶活最大，达 41 880.11U/ml；大于 7g/L 时木聚糖酶酶活就开始下降，由此可以得出在单因素改变的情况下，蛋白胨浓度为 7g/L 时木聚糖酶酶活最高。

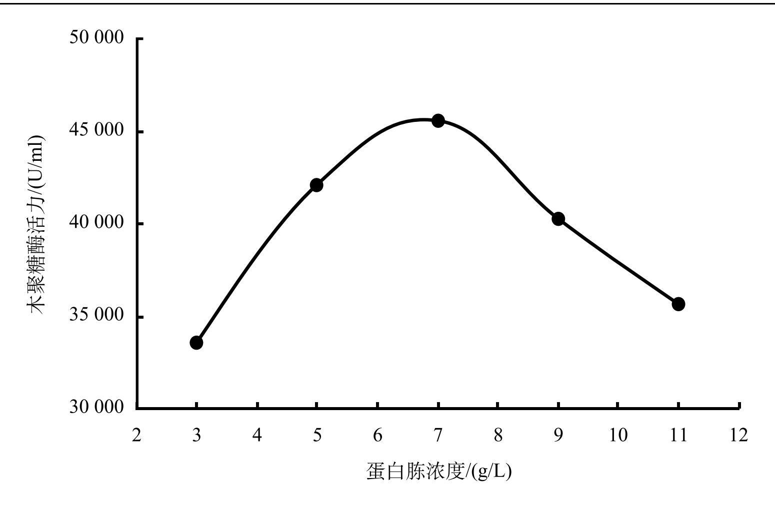


图 2-72　蛋白胨浓度对木聚糖酶酶活的影响

四、底物浓度对芽胞杆菌产木聚糖酶的影响

以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，不同浓度的底物对产酶的影响见图 2-73：木聚糖浓度为 2～8g/L 时木聚糖酶酶活逐渐增加，大于 8g/L 时木聚糖酶酶活下降。这个实验说明木聚糖酶是一种诱导酶，当木聚糖的量达一定程度时会出现底物抑制现象，由此可以得出单因素改变的情况下，底物浓度为 8g/L 时木聚糖酶酶活最高为 55 934.28U/ml。

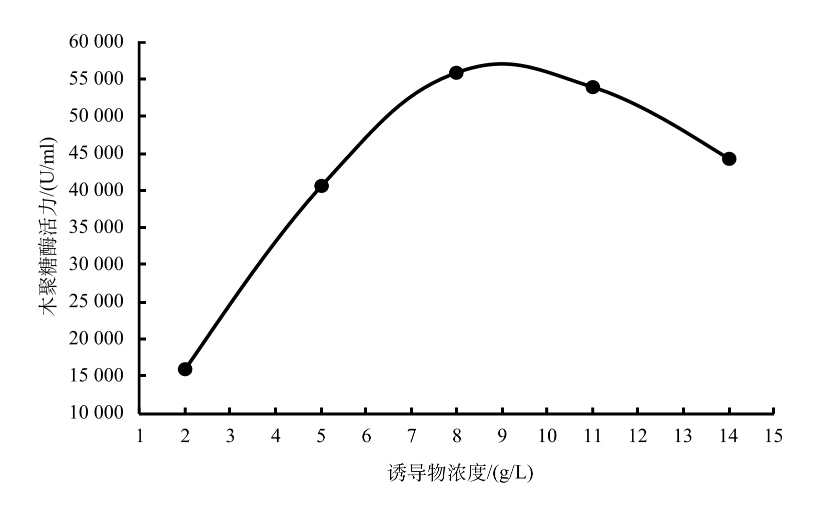


图 2-73　底物浓度对木聚糖酶酶活的影响

五、芽胞杆菌产木聚糖酶的营养条件优化

在氮源和碳源单因素试验的基础上，选定碳源浓度、氮源浓度、底物浓度 3 个因素，每个因素确定 3 个水平，设计三因素三水平的正交表 $L_9(3^3)$（表 2-48）。

表 2-48　正交表 $L_9(3^3)$ 因素水平表

水平	不同浓度蛋白胨/（g/L）	不同浓度底物/（g/L）	不同浓度酵母粉/（g/L）
1	5	6	7
2	7	8	9
3	9	10	11

以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，根据碳源、氮源、底物单因素试验结果，选取每个因素合适的水平进行正交试验，正交试验结果见表 2-49。

表 2-49　正交试验结果

水平	蛋白胨不同浓度/（g/L）	底物不同浓度/（g/L）	酵母粉不同浓度/（g/L）	酶活性/（U/ml）	酶活性/（U/ml）	酶活性/（U/ml）
1	5	6	7	58662.25	65620.11	62555.26
2	5	8	9	74 216.33	75 740.32	73 200.61
3	5	10	11	69 241.34	65 655.21	65 090.21
4	7	6	9	55 972.28	52 420.32	56 125.65
5	7	8	11	56 073.52	60 570.81	53 300.43
6	7	10	7	83 086.47	80 755.12	82 220.29
7	9	6	11	52 904.49	55 845.16	58 640.45
8	9	8	7	78 403.13	77 955.43	80 870.26
9	9	10	9	71 121.42	70 080.54	75 140.47
*K*1	609 981.64	518 745.97	670 128.32			
*K*2	580 524.89	630 330.84	604 017.94			
*K*3	620 961.35	662 391.07	537 321.62			
*k*1	203 327.21	172 915.32	223 376.11			
*k*2	193 508.30	210 110.28	201 339.31			
*k*3	206 987.12	220 797.02	179 107.21			
R	40 436.46	143 645.1	132 806.7			

极差 *R* 分析结果显示（表 2-50），各因素影响菌株 *B. safensis* FJAT-14260 产木聚糖酶的主次因素为 B >C >A，多个方面分析得到产酶的最佳培养基组合为 $B_3C_1A_3$。在正交表中没有这个处理组合，所以需要验证这个组合的可行度。经过试验验证这个培养基组合的酶活值比正交表中产酶最高的酶活值都高。因此通过本次试验确定 *B. safensis* FJAT-14260 的最佳发酵培养基为底物浓度 10g/L、酵母粉浓度 7g/L、蛋白胨浓度 9g/L、NaCl 3.0g、K_2HPO_4 1.0g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5g。

表 2-50　正交试验方差分析结果

因素	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
第 1 列	97 161 535.17	2	48 580 767.58	2.8873	不显著
第 2 列	1 263 442 826	2	631 721 413.2	37.5455	极显著
第 3 列	979 874 111.5	2	489 937 055.7	29.1187	极显著
合并误差	336 510 231.7	20	16 825 511.58		

六、培养条件对芽胞杆菌产木聚糖酶活性的影响

基于以上优化后的培养基，设计不同的培养条件，见表 2-51。分别测定其单因素条件改变下的酶活。

表 2-51　不同培养条件水平表

项目	A	B	C	D	E
温度/℃	25	30	35	40	45
pH	5	6	7	8	9
装液量/ml	30	50	70	90	110

1）温度对芽胞杆菌产木聚糖酶活性的影响。以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，利用最优发酵液培养基，不同培养温度的改变对产酶的影响见图 2-74：培养温度为 30℃时木聚糖酶活性最大为 87 380.25U/ml，当培养温度为 35℃、40℃、45℃时木聚糖酶酶活处在很低的水平。

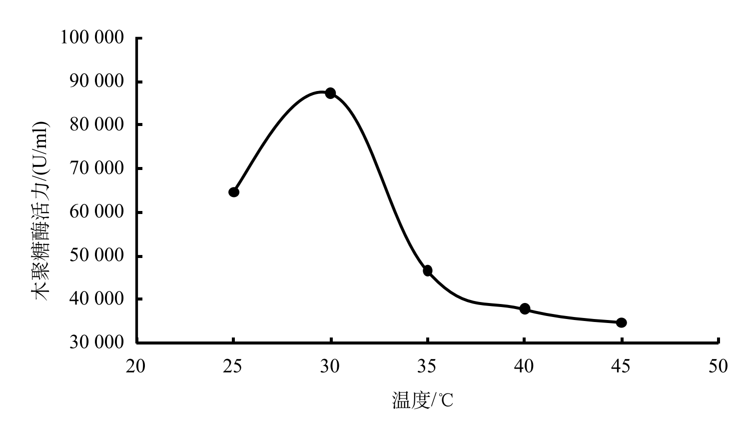


图 2-74　培养温度对木聚糖酶酶活的影响

2）初始 pH 对芽胞杆菌产木聚糖酶活性的影响。以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，利用最优发酵液培养基，不同初始 pH 的改变对产酶的影响见图 2-75：初始 pH 为 5～7 时木聚糖酶活性逐渐增加，酶活性的增加并不是很明显，当 pH 为 8～9

时酶活性逐渐下降，并且下降趋势显著，强碱性的环境可能会影响产酶的量，所以只在单因素改变的情况下最适初始 pH 为 7，此时木聚糖酶活性为 87 380.25U/ml。

3）装液量对芽胞杆菌产木聚糖酶活性的影响。以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，利用最优发酵液培养基，装液量的改变对产酶的影响见图 2-76：在 250ml 三角瓶中装液量为 50ml 时酶活性最高为 87 380.25U/ml，此时为最适装液量。当装液量为 30～50ml 时木聚糖酶酶活逐渐增加，当大于 50ml 装液量时由于液体太多，溶氧不足导致微生物生长缓慢，代谢异常，阻碍产酶。

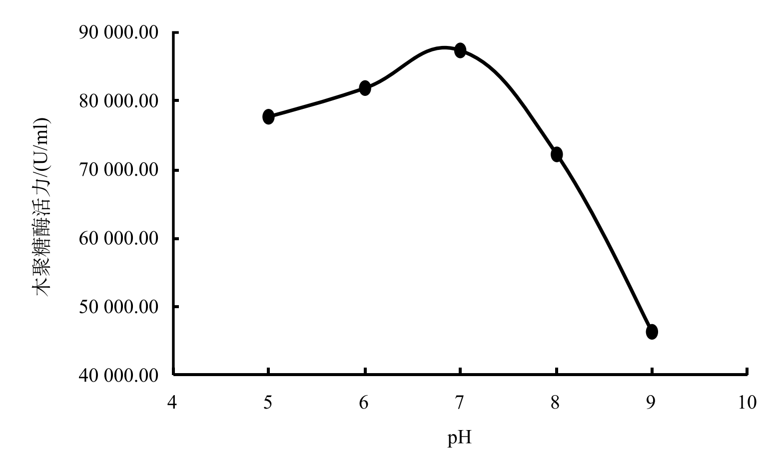


图 2-75　初始 pH 对木聚糖酶酶活的影响

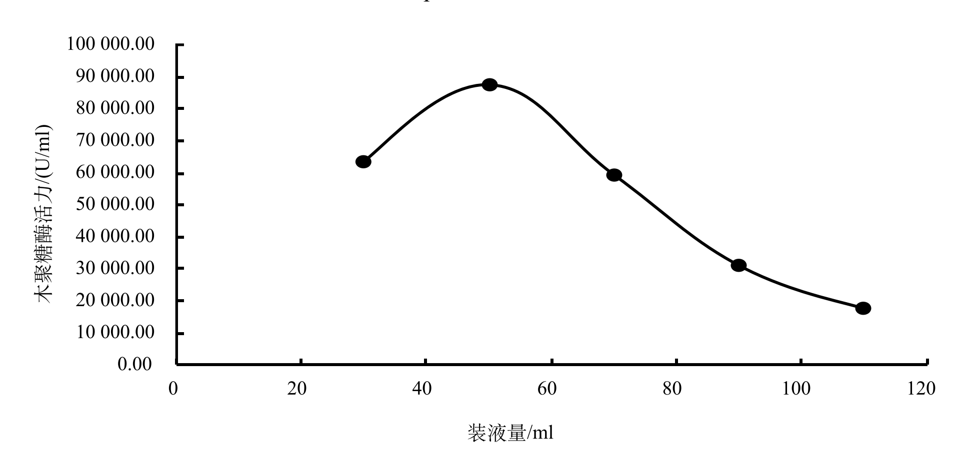


图 2-76　装液量对木聚糖酶酶活的影响

七、芽胞杆菌产木聚糖酶的培养条件优化

在单因素优化的基础上，设计正交表 $L_9(3^3)$，测定酶活，确定最佳综合培养条件（表 2-52）。以测定最佳培养条件为基础，以 2%的接种量接种进行发酵，取样时间为 0h、8h、16h、24h、…、72h，共取样 9 次，测定酶活。

表 2-52　因素水平表

水平	初始 pH	培养温度/℃	装液量/ml
1	6	25	30
2	7	30	50
3	8	35	70

以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，根据培养温度、初始 pH、装液量单因素试验结果，选取每个因素合适的水平进行正交试验，正交试验结果见表 2-53。

表 2-53　正交试验结果

处理号	初始 pH	培养温度	装液量	酶活性/（U/ml）	酶活性/（U/ml）	酶活性/（U/ml）
	A 组	B 组/℃	C 组/ml			
1	6	25	30	81 812.08	92 990.31	73 921.38
2	6	30	50	72 311.71	83 564.5	85 115.05
3	6	35	70	36 413.12	47 054.44	46 636.31
4	7	25	70	29 500.37	30 947.05	28 899.01
5	7	30	30	90 775.54	110 179	102 780.4
6	7	35	50	63 161.82	84 459.36	83 173.54
7	8	25	50	59 276.66	71 580.91	67 633.43
8	8	30	70	49 895.60	56 152.13	56 623.52
9	8	35	30	89 030.57	96 129.75	78 998.1
*K*1	619 818.90	536 561.20	642 189.74			
*K*2	623 876.09	707 397.45	594 496.11			
*K*3	625 320.67	625 057.01	632 329.81			
*k*1	206 606.30	178 853.73	214 063.25			
*k*2	207 958.70	235 799.15	198 165.37			
*k*3	208 440.22	208 352.34	210 776.60			
R	5 501.77	170 836.25	47 693.63			

极差 *R* 分析结果显示（表 2-54），各因素影响菌株 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）产木聚糖酶的主次因素为 $B>A>C$，多个方面分析得到产酶的最佳培养基组合为 $B_2A_3C_1$。在正交表中没有这个处理组合，所以需要验证这个组合的可行度。经过试验验证这个培养基组合的酶活值比正交表中产酶最高的酶活值都高。因此通过本次试验确定 FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）的最佳发酵条件为培养温度 30℃、初始 pH8、装液量为 30ml。

表 2-54　正交试验方差分析结果

因素	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
第 1 列	1 808 039.82	2	904 019.91	0.0149	0.9852
第 2 列	1 622 091 880.04	2	811 045 940.02	13.4122	0.0003
第 3 列	140 862 571.03	2	70 431 285.52	1.1647	0.3344
重复误差	1 088 471 391.07	18	60 470 632.84		

八、发酵时间对芽胞杆菌产木聚糖酶的影响

以沙福芽胞杆菌 *B. safensis* FJAT-14260 为例，基于以上最优发酵条件，每 8h 取样跟踪 *B. safensis* FJAT-14260 的生长曲线和产酶曲线见图 2-77：在 24h 时 OD 值进入稳定期，8～32h 酶活迅速增加，到 32h 达最高为 113 585.78U/ml，然后逐渐达一个稳定的状态。

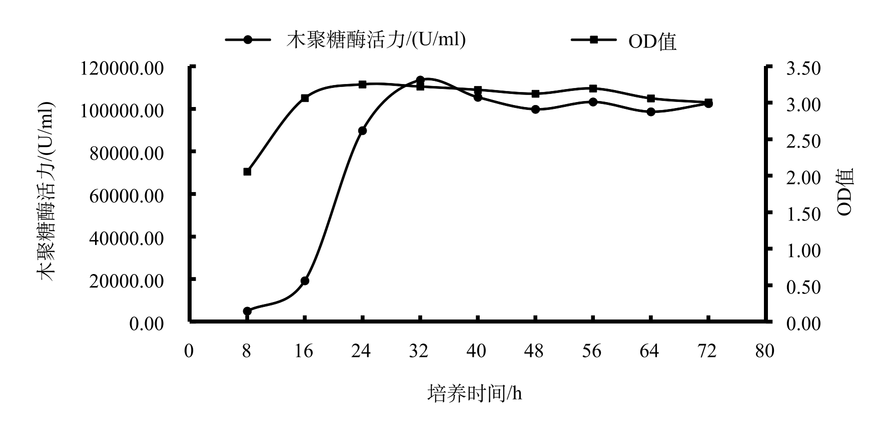
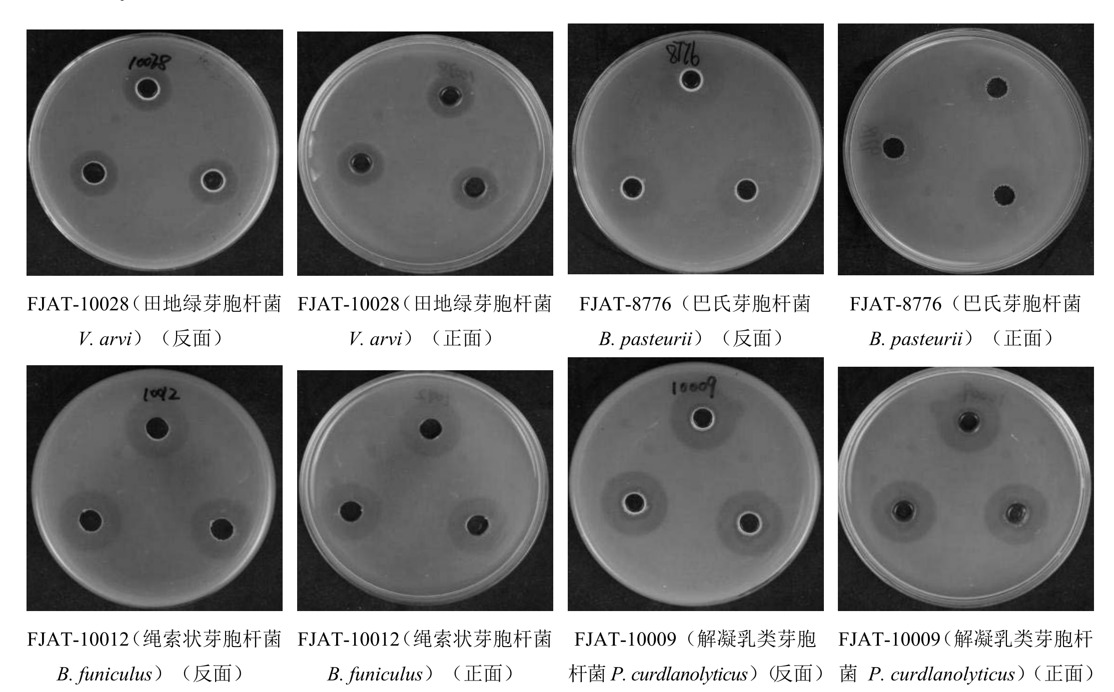


图 2-77　不同发酵时间的产酶曲线和生长曲线

九、芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈测定

实验用芽胞杆菌均选自福建省农业科学院农业生物资源研究所菌种库。经实验观察测定，37 株芽胞杆菌的平板上有明显的水解透明圈，它们是 FJAT-14215（科研中心芽胞杆菌 *B. cecembensis*）、FJAT-8757（栗褐芽胞杆菌 *B. badius*）、FJAT-8774（巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*）、FJAT-8766（纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 *L. fusiformis*）、FJAT-8789（干燥耐热芽胞杆菌 *B. xerothermodurans*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14232（土壤芽胞杆菌 *B. soli*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌 *B. borstelensis*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-10028（田地绿芽胞

杆菌 *V. arvi* ）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-10029（嗜碳芽胞杆菌 *B. carboniphilus*）、FJAT-10010（内生芽胞杆菌 *B. endophyticus*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）、FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）（图 2-78）。



FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌 *V. arvi*）（反面）　FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌 *V. arvi*）（正面）　FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）（反面）　FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）（正面）

FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）（反面）　FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）（正面）　FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）（反面）　FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）（正面）

图 2-78　芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈

十、芽胞杆菌木聚糖酶活性分析

菌种均选自福建省农业科学院农业生物资源研究所菌种库，筛选出有木聚糖酶活性的菌株 37 株，其水解透明圈 *H*/*C* 值和木聚糖酶活性见表 2-55。从表中可知，①不同种类的芽胞杆菌产木聚糖酶的能力差异很大；②芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值为 1.58～5.12，种类间木聚糖酶 *H*/*C* 值相差 3.24 倍；③芽胞杆菌木聚糖酶活性为 1.29～24 597.65U/ml，种类间木聚糖酶酶生产能力相差 19 067.9 倍；④芽胞杆菌种类间的木聚糖

酶水解透明圈 *H*/*C* 值与木聚糖酶活性之间无线性关系。

表 2-55　芽胞杆菌产木聚糖酶活性测定

	菌株名称	木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值	木聚糖酶活性/（U/ml）
1	FJAT-14215（科研中心芽胞杆菌 *B. cecembensis*）	3.37	1.29
2	FJAT-8757（栗褐芽胞杆菌 *B. badius*）	3.47	1.29
3	FJAT-8774（巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*）	5.12	1.29
4	FJAT-8766（纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 *L. fusiformis*）	3.70	1.63
5	FJAT-8789（干燥耐热芽胞杆菌 *B. xerothermodurans*）	3.12	1.97
6	FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）	5.01	4.79
7	FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）	3.26	11.95
8	FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）	2.77	15.99
9	FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）	3.32	17.62
10	FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）	2.37	17.63
11	FJAT-14232（土壤芽胞杆菌 *B. soli*）	2.01	21.09
12	FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）	3.60	34.09
13	FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）	3.10	44.27
14	FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）	3.60	61.15
15	FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌 *B. borstelensis*）	1.59	82.90
16	FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）	3.55	88.84
17	FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）	3.35	97.25
18	FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌 *V. arvi*）	2.02	100.54
19	FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）	3.37	109.60
20	FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）	3.28	117.10
21	FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）	3.37	129.32
22	FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticu*s）	3.37	140.17
23	FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）	2.58	157.18
24	FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）	3.28	258.21
25	FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）	3.33	335.57
26	FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）	2.75	351.79
27	FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）	3.09	382.95
28	FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）	3.77	390.22
29	FJAT-10029（嗜碳芽胞杆菌 *B. carboniphilus*）	1.58	398.89
30	FJAT-10010（内生芽胞杆菌 *B. endophyticus*）	3.48	399.76
31	FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）	2.23	422.20
32	FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）	1.65	437.82
33	FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）	4.38	505.28
34	FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）	2.95	518.30

续表

	菌株名称	木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值	木聚糖酶活性/（U/ml）
35	FJAT-14210（韩国芽孢杆菌 *B. koreensis*）	2.79	579.79
36	FJAT-8779（短小芽孢杆菌 *B. pumilus*）	4.36	18 249.82
37	FJAT-14260（沙福芽孢杆菌 *B. safensis*）	4.70	24 597.65

十一、芽孢杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-55 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽孢杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-79，可以将 37 株芽孢杆菌产木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为 3 类：

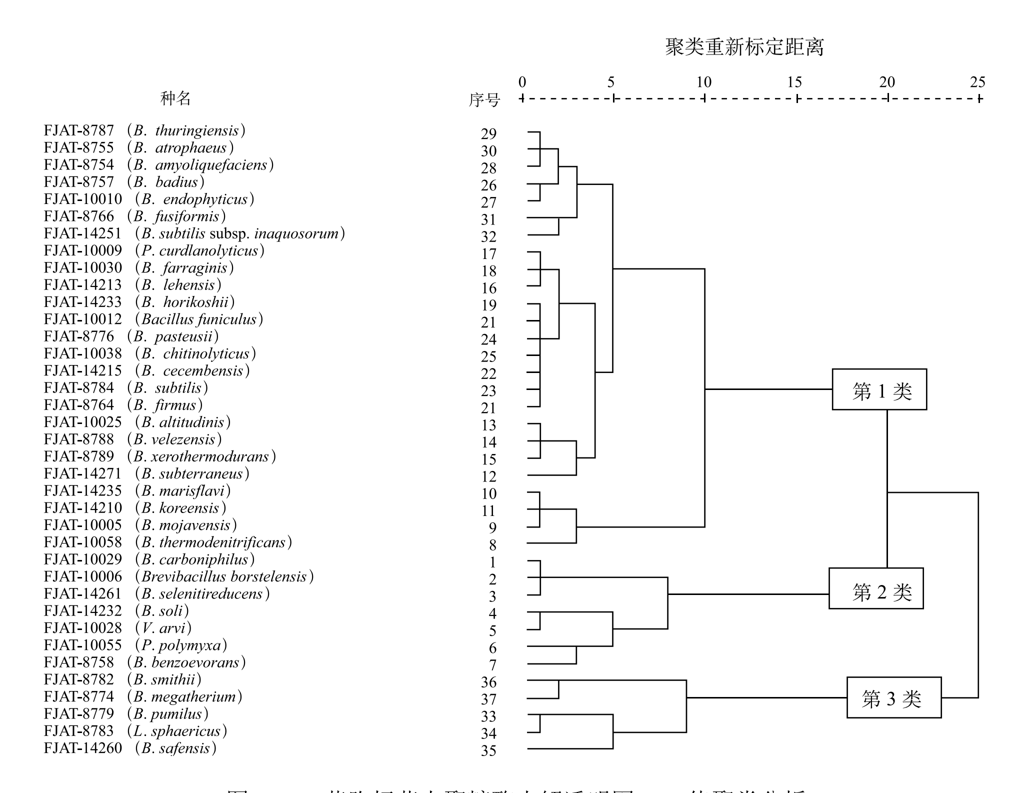


图 2-79　芽孢杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

第 1 类，木聚糖酶水解透明圈大小中等，*H*/*C* 值为 2.58～3.77，其包含了 25 种芽孢杆菌，即 FJAT-10058（热脱氮地芽孢杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10005（莫哈维芽孢杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-14235（黄海芽孢杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14210（韩国芽孢杆菌 *B. koreensis*）、FJAT-14271（地下芽孢杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-10025（高地芽孢杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-8788（贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8789（干燥耐热芽孢杆菌 *B. xerothermodurans*）、FJAT-14213（列城芽孢杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-10009（解凝乳类芽孢杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-10030（混料芽孢杆菌

B. farraginis）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-14215（科研中心芽胞杆菌 *B. cecembensis*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）、FJAT-8757（栗褐芽胞杆菌 *B. badius*）、FJAT-10010（内生芽胞杆菌 *B. endophyticus*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-8766（纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 *L. fusiformis*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）。

第 2 类，木聚糖酶水解透明圈较小，*H*/*C* 值为 1.58～2.37，其包括了 7 个芽胞杆菌，即 FJAT-10029（嗜碳芽胞杆菌 *B. carboniphilus*）、FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌 *Brevibacillus borstelensis*）、FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *Bacillus selenitireducens*）、FJAT-14232（土壤芽胞杆菌 *B. soli*）、FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌 *V. arvi*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）。

第 3 类，木聚糖酶水解透明圈较大，*H*/*C* 值为 4.36～5.12，其包含了 5 种芽胞杆菌，即 FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8774（巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*）。

十二、芽胞杆菌木聚糖酶活性聚类分析

利用表 2-55 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 37 株芽胞杆菌的木聚糖酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-80。芽胞杆菌木聚糖酶活性可以分为 3 类。

第 1 类：该类芽胞杆菌木聚糖酶活性较低，为 1.29～117.10U/ml，其包含了 20 种芽胞杆菌，即 FJAT-14215（科研中心芽胞杆菌 *B. cecembensis* ）、FJAT-8757（栗褐芽胞杆菌 *B. badius*）、FJAT-8774（巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*）、FJAT-8766（纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 *L. fusiformis*）、FJAT-8789（干燥耐热芽胞杆菌 *B. xerothermodurans*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14232（土壤芽胞杆菌 *B. soli*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌 *Brevibacillus borstelensis*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌 *V. arvi*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）。

第 2 类：芽胞杆菌木聚糖酶活性较高，为 129.32～579.79U/ml，其包含了 15 种芽胞杆菌，即 FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、

FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-10029（嗜碳芽胞杆菌 *B. carboniphilus*）、FJAT-10010（内生芽胞杆菌 *B. endophyticus*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）。

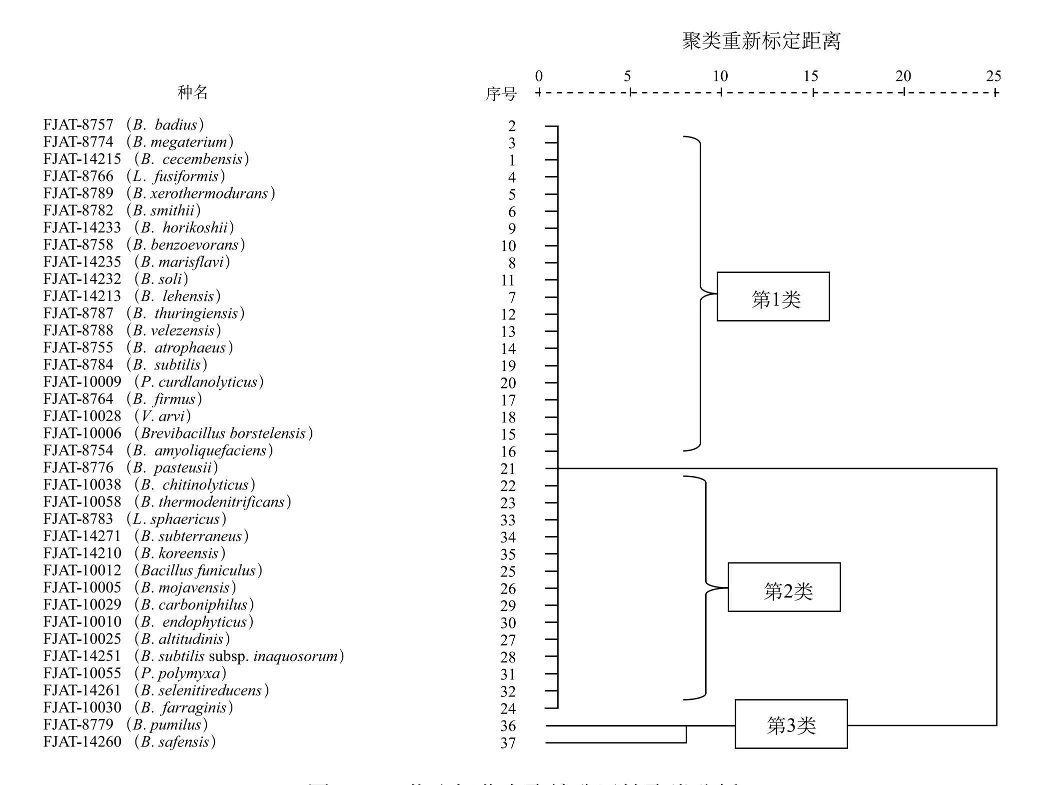


图 2-80　芽胞杆菌木聚糖酶活性聚类分析

第 3 类：芽胞杆菌木聚糖酶活性高，为 18 249.82～24 597.65U/ml，其包含了两种芽胞杆菌，FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）。

十三、芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择既测定过木聚糖酶水解透明圈，又测定了木聚糖酶活性的共 37 株芽胞杆菌，建立数据矩阵（表 2-55）。芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在着 4 种类型：①芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值大而木聚糖酶活性低，如 FJAT-8774（巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*），*H*/*C* 值 5.12，木聚糖酶活性 1.29U/ml；②芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而木聚糖酶活性高，如 FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*），*H*/*C* 值为 1.65，木聚糖酶活性 437.82U/ml；③芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值大同时木聚糖酶活性高，如 FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*），*H*/*C* 值为 4.36 ，木聚糖酶活性 18 249.82U/ml；④芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值小同时木聚糖酶活性低，如 FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌 *B. borstelensis*），*H*/*C* 值为 1.59，

木聚糖酶活性 82.90U/ml。芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值和木聚糖酶活性经常是不同步的，这与其生物学特性有关，作者检测的时期，也许是芽胞杆菌木聚糖酶检测的最好时期，但对于木聚糖酶水解透明圈的测定不是最佳时期，同样，培养条件、营养条件、菌株种类等都有影响。

以欧氏距离为尺度，用类平均法进行聚类分析，聚类图见图 2-81。聚类结果基于木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值与木聚糖酶活性将芽胞杆菌分为 3 类。

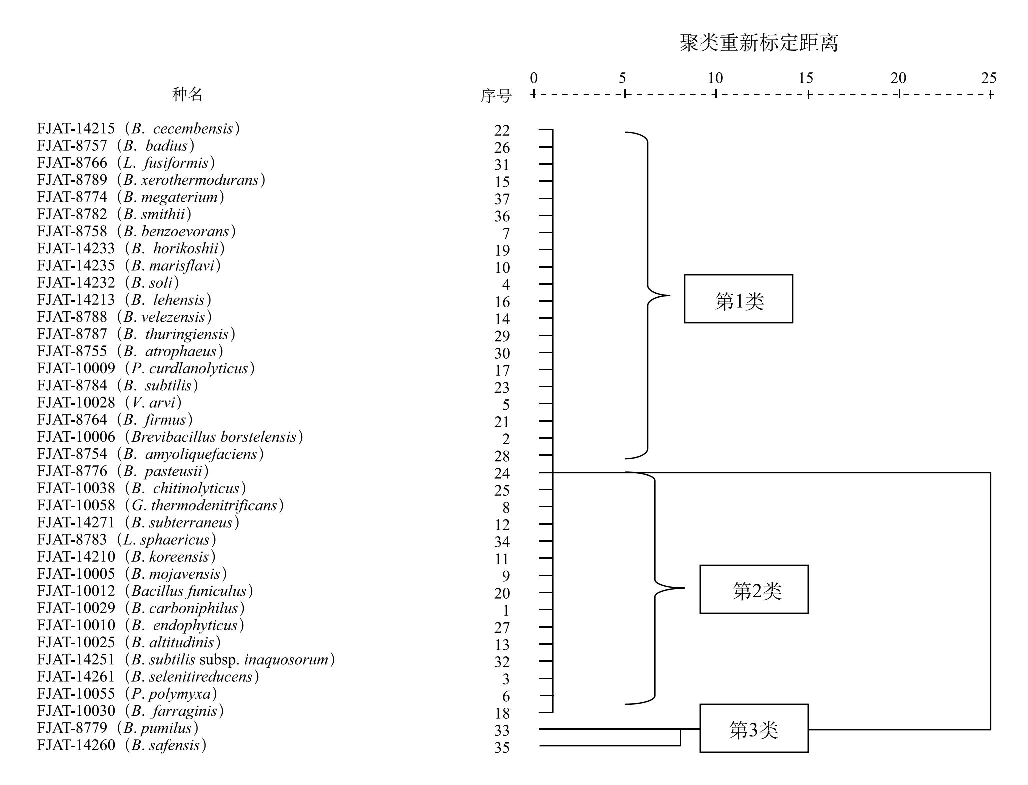


图 2-81　芽胞杆菌木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值与木聚糖酶活性的相互关系聚类分析

第 1 类：20 株芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌木聚糖酶活性较低，为 1.29～117.10U/ml，木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化较大，为 1.59～5.12，包括 FJAT-10006（波茨坦短芽胞杆菌 *B. borstelensis*）、FJAT-14232（土壤芽胞杆菌 *B. soli*）、FJAT-10028（田地绿芽胞杆菌 *V. arvi*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-8788（贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*）、FJAT-8789（干燥耐热芽胞杆菌 *B. xerothermodurans*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-10009（解凝乳类芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）、FJAT-14233（堀越氏芽胞杆菌 *B. horikoshii*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-14215（科研中心芽胞杆菌 *B. cecembensis*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-8757（栗褐芽胞杆菌 *B. badius*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-8787（苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*）、FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）、FJAT-8766（纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 *L. fusiformis*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8774

（巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*）。

第 2 类：15 株芽胞杆菌聚为一类，其特点是木聚糖酶活性较高，为 129.32～505.28 U/ml，木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值较小，为 1.58～3.77，包括了 FJAT-10029（嗜碳芽胞杆菌 *B. carboniphilus*）、FJAT-14261（还原硒酸盐芽胞杆菌 *B. selenitireducens*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-10025（高地芽胞杆菌 *B. altitudinis*）、FJAT-10030（混料芽胞杆菌 *B. farraginis*）、FJAT-10012（绳索状芽胞杆菌 *B. funiculus*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）、FJAT-10010（内生芽胞杆菌 *B. endophyticus*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）。

第 3 类：两株芽胞杆菌聚成一类，其特点是木聚糖酶活性高，为 18 249.82～24 597.65 U/ml，木聚糖酶水解透明圈 *H*/*C* 值差异较大，为 4.36～4.70，包括 FJAT-8779（短小芽胞杆菌 *B. pumilus*）、FJAT-14260（沙福芽胞杆菌 *B. safensis*）。

第十节　芽胞杆菌产普鲁兰酶特性

一、概述

普鲁兰酶（pullulanase，EC3.2.1.41）是一种可以水解 α-1,6-糖苷键的脱支酶，因最初发现该种酶可以水解普鲁兰糖的 α-1,6-糖苷键，所以称为普鲁兰酶（Ling *et al.*，2009）。普鲁兰酶可单独使用，也可与其他酶协同作用。例如，普鲁兰酶在高葡萄糖浆生产、啤酒麦芽糖化、改性淀粉食品生产、歧化环糊精生产及与 β-淀粉酶配合使用生产麦芽糖过程中等都有广泛应用（朱梦，2010）。普鲁兰酶的工业生产主要依赖国外市场，由于价格昂贵，国内大多数研究主要集中在产普鲁兰酶的菌株选育上，对于芽胞杆菌产普鲁兰酶的研究较少，人们研究过以下 3 种芽胞杆菌产普鲁兰酶特性。

（1）地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）

对地衣芽胞杆菌基因组序列分析显示，其中标注为 *amyX* 的基因可能编码普鲁兰酶。以 PCR 方法，从地衣芽胞杆菌染色体 DNA 中扩增出 *amyX* 基因蛋白质编码区，插入大肠杆菌表达载体 pET28aT7 启动子下游。含重组质粒的大肠杆菌菌株 BL21（DE3）在 IPTG 诱导下表达出有活性的普鲁兰酶。酶学性质初步分析，最适 pH 为 6.0（张明焱等，2009）。

（2）嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌（*G. stearothermophilus*）

嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌经细胞破碎机破壁后，采用硫酸铵盐析法去除杂蛋白，DEAE-32 阴离子交换纤维素纯化胞内普鲁兰酶，并通过 L_9（3^4）正交试验优化盐析除杂蛋白工艺条件。结果表明：菌体与缓冲液比为 1∶3、硫酸铵饱和度 40%、pH7.0 分离效果最佳，其中，pH 对分离效果的影响差异性显著（$P<0.05$）；纯化后的普鲁兰酶比活力为 26.50U/mg，纯化倍数为 8.01，回收率为 73%；经 SDS-PAGE 检测，显示一条电泳区带，分子质量为 55.4ku，表明获得了纯酶（赵淑琴等，2011）。

（3）长野芽胞杆菌（*B. naganoensis*）

利用基因工程手段获得的产长野芽胞杆菌普鲁兰酶的枯草芽胞杆菌基因工程菌株 WB600/pWB-pulB，通过单因素筛选及正交试验进行发酵培养基优化，得到产酶最佳配方为玉米淀粉 3.0%、酵母膏 2.0%、$CaCl_2$ 0.03%、Na_2HPO_4 1.0%。同时对重组菌株摇瓶条件下液体发酵的主要影响因素——初始 pH、接种量、装液量、转速、温度等进行探讨，确定了产酶最佳培养条件为，以 3%接种量接种于优化后培养基，初始 pH7.0，装液量 30ml/250ml，37℃、200r/min 摇床培养 36h。在此优化条件下，普鲁兰酶活性达 20.16U/ml，是之前研究结果（10.94 U/ml）的 1.84 倍（刘逸寒等，2012）。

二、营养条件对芽胞杆菌产普鲁兰酶的影响

1. 碳源对芽胞杆菌产普鲁兰酶的影响

不同碳源对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)产普鲁兰酶的影响见图 2-82。实验结果表明，以酵母粉为唯一碳源时普鲁兰酶活性最高，为 41.4U/ml；以玉米淀粉为唯一碳源时，普鲁兰酶活性最低为 3.73U/ml，所以普鲁兰酶发酵液培养基中最适碳源为酵母粉。

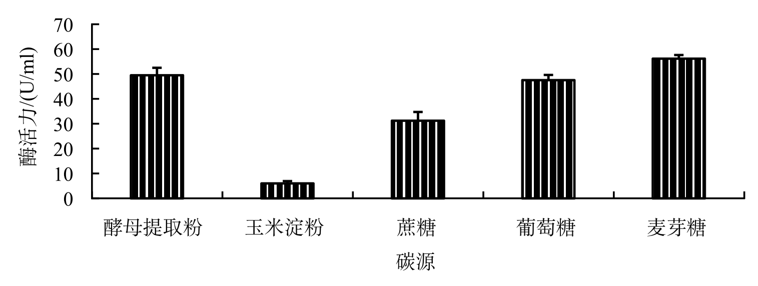


图 2-82　不同碳源对解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens* FJAT-2349)产普鲁兰酶的影响

2. 氮源对芽胞杆菌产普鲁兰酶活性的影响

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349(*B. amyloliquefaciens*)为例，在碳源优化的基础上，采用类似的方法探究两种发酵液培养基中最适氮源，结果见图 2-83。优化普鲁兰酶液体发

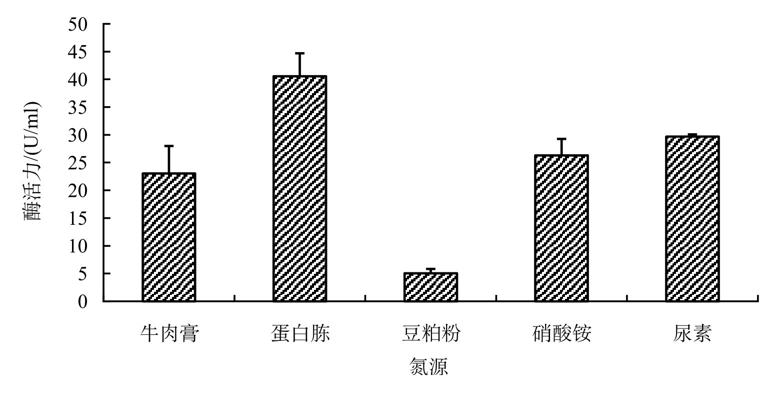


图 2-83　不同氮源对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)产鲁兰酶的影响

酵培养基时以蛋白胨为唯一氮源时，普鲁兰酶活性最高为 40.60U/ml，其他氮源都不能达到，所以普鲁兰酶发酵液培养基中最适氮源为蛋白胨。

3. 碳氮比对芽胞杆菌产普鲁兰酶活性的影响

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)为例，在以上优化的基础上，探究两种发酵液培养基中最优碳氮比，结果见图 2-84。在普鲁兰酶液体发酵液培养基中最佳碳氮比为 2∶1，此时普鲁兰酶活性为 69.67U/ml。

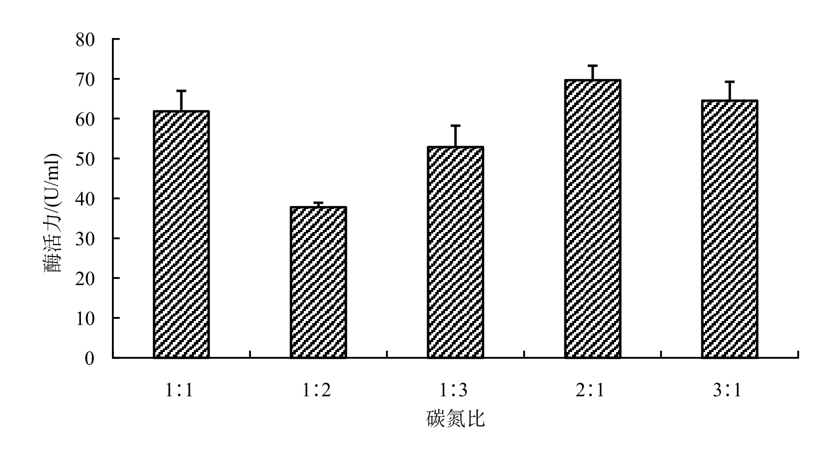


图 2-84　不同碳氮比对解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) FJAT-2349 产普鲁兰酶的影响

三、培养条件对芽胞杆菌产普鲁兰酶的影响

1. 温度对芽胞杆菌产普鲁兰酶活性的影响

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)为例，在以上优化条件的基础上改变培养温度，探究对产酶的影响，结果见图 2-85。最适培养温度在 35℃时，普鲁兰酶活性达最高为 75.60U/ml。

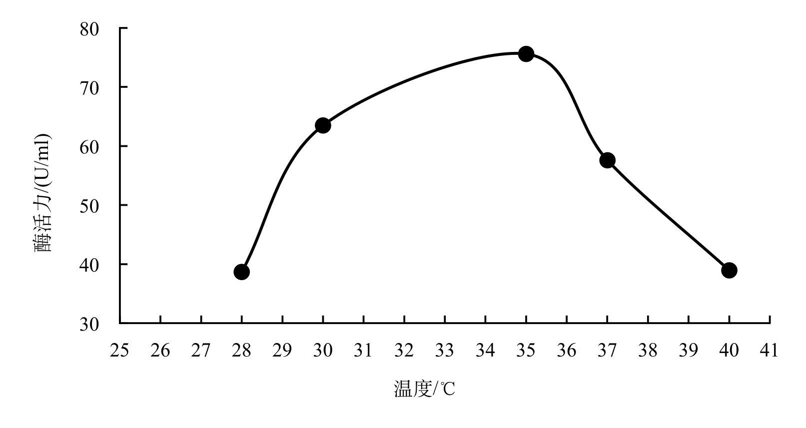


图 2-85　不同温度对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)产普鲁兰酶的影响

2. 转速对芽胞杆菌产普鲁兰酶活性的影响

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)为例，在以上优化条件的基础上改变转速，探究对产酶的影响结果见图 2-86。由图 2-86 可知产普鲁兰酶的培养转速为 130～190r/min 时，普鲁兰酶活性逐渐升高，210r/min 时普鲁兰酶活性有下降趋势，在 190r/min 时普鲁兰酶活性达最高，为 81.62U/ml。

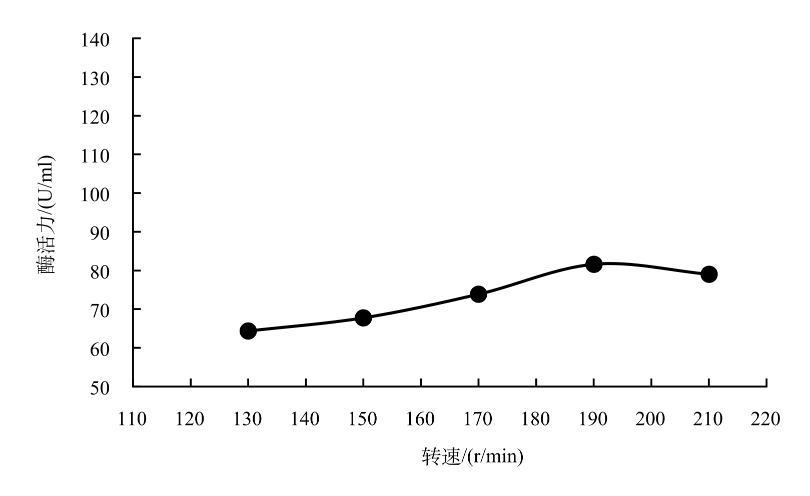


图 2-86　不同转速对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)产普鲁兰酶的影响

3. 初始 pH 对芽胞杆菌产普鲁兰酶活性的影响

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)为例，在以上优化条件的基础上调节初始 pH，探究对产酶的影响，结果见图 2-87。普鲁兰酶的初始 pH 为 5～8 时，普鲁兰酶活性逐渐升高，初始 pH 为 9 时普鲁兰酶活性略有下降，上升下降的趋势没有很显著的特征，证明初始 pH 对产普鲁兰酶的影响不大，最佳初始 pH 为 8，普鲁兰酶活性为 86.08U/ml。

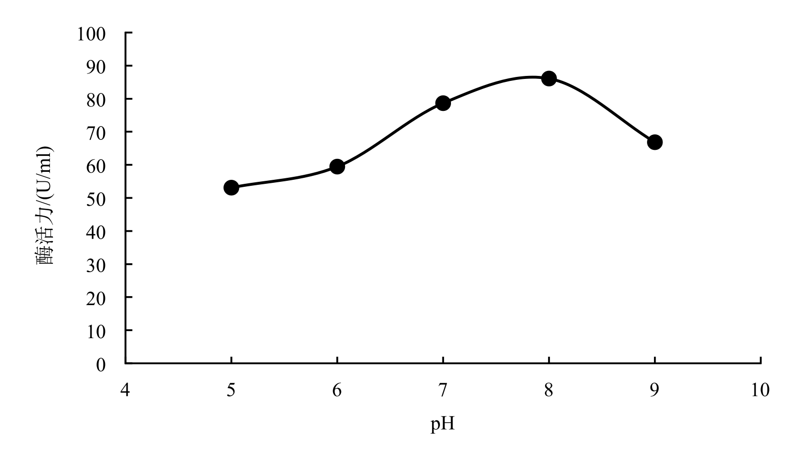


图 2-87　不同 pH 对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*)产普鲁兰酶的影响

4. 发酵时间对芽胞杆菌产普鲁兰酶的影响

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*) 为例，基于以上最优发酵条件，每 8h 取样跟踪解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*) 的产普鲁兰酶曲线和生长 OD 值见图 2-88。通过单因素法优化发酵条件以后，种子液接种到初始 pH 为 8 的优化后培养基，置 35℃、190r/min 中培养；每 8h 取样跟踪解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*) 的产普鲁兰酶曲线和生长 OD 值（图 2-90）：在 8～48h 酶活逐渐增加，48h 普鲁兰酶酶活达最大为 86.40U/ml，48h 以后普鲁兰酶酶活下降，下降一定程度后基本趋于稳定状态；在 8～40h OD_{600} 值逐渐增加然后趋于稳定，这与普鲁兰酶是诱导酶的条件相符合，菌体裂解以后释放胞外酶。

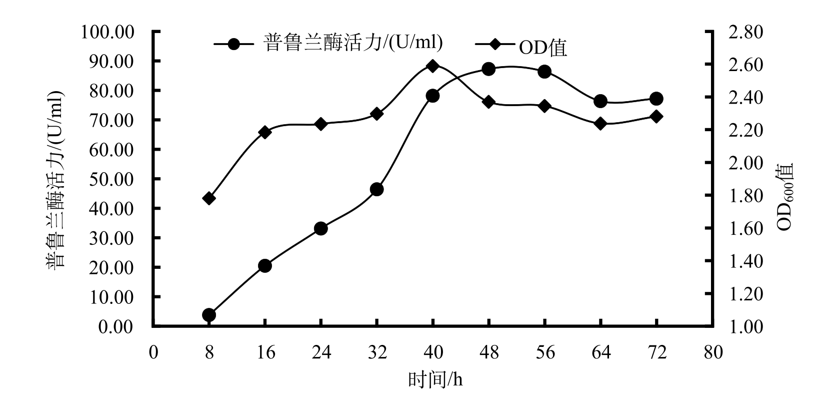
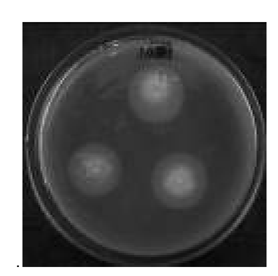


图 2-88　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-2349 (*B. amyloliquefaciens*) 不同发酵时间的产酶曲线和生长曲线

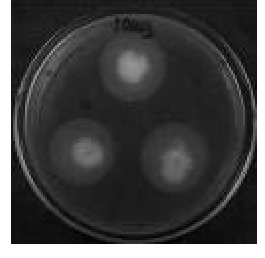
四、芽胞杆菌产普鲁兰酶水解透明圈的测定

经实验观察测定，120 株标准芽胞杆菌中有 46 株菌的平板上有明显的水解透明圈（图 2-89）。



FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）（反面）

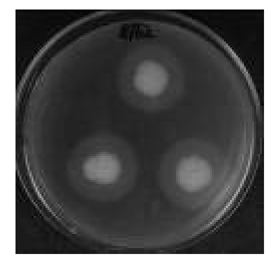
FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）（正面）



FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）（反面）

FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）（正面）

图 2-89　芽胞杆菌产普鲁兰酶水解透明圈的测定



FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）（反面）

FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）（正面）

FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）（反面）

FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）（正面）

图 2-89 （续）

五、芽胞杆菌产普鲁兰酶活性分析

芽胞杆菌普鲁兰酶活性测定。初筛具有产淀粉酶能力的 36 株芽胞杆菌，在 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养 48h 后的 *H*/*C* 值见表 2-56。其中 FJAT-14204(浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）、FJAT-14248（马氏芽胞杆菌 *B. macyae*）所产的普鲁兰酶活性明显高于其他菌株的酶活性，且 FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）菌株普鲁兰酶活性达 42.27U/ml。

表 2-56　芽胞杆菌产普鲁兰酶活性测定

	菌株名称	*H*/*C* 平均值	酶活/（U/ml）
1	FJAT-8761（环状芽胞杆菌 *B. circulans*）	2.56	−9.96
2	FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）	2.03	−9.2
3	FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）	2	−8.15
4	FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）	1.98	−6.91
5	FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）	2.19	−5.91
6	FJAT-8772（海洋芽胞杆菌 *B. marinus*）	1.85	−5.58
7	FJAT-8760（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）	1.94	−5.48
8	FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）	1.65	−4.1
9	FJAT-8762（克劳氏芽胞杆菌 *B. clausii*）	1.95	−3.29
10	FJAT-8765（弯曲芽胞杆菌 *B. flexus*）	1.99	−1.14
11	FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）	2.13	0.05
12	FJAT-10020（解葡聚糖类芽胞杆菌 *P. glucanolyticus*）	1.39	0.05
13	FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）	1.98	0.14
14	FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）	1.64	0.38
15	FJAT-14251（ 枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）	2.01	0.6
16	FJAT-10003（解淀粉芽胞杆菌 *P. amylolyticus*）	1.99	0.76
17	FJAT-10021（强壮类芽胞杆菌 *P. validus*）	1.65	0.81
18	FJAT-10053（泛酸枝芽胞杆菌 *V. pantothenticus*）	2.1	0.91
19	FJAT-10037（解半纤维素芽胞杆菌 *B. hemicellulosilyticus*）	1.89	0.95

续表

	菌株名称	H/C 平均值	酶活/（U/ml）
20	FJAT-8780（施氏芽胞杆菌 *B. schlegelii*）	3.91	1.57
21	FJAT-10042（罕见芽胞杆菌 *B. barbaricus*）	1.75	1.76
22	FJAT-10022（盐敏芽胞杆菌 *B. halmapalus*）	2.92	1.86
23	FJAT-10058（热脱氮地芽胞杆菌 *G. thermodenitrificans*）	1.74	1.91
24	FJAT-8775（蕈状芽胞杆菌 *B. mycoides*）	1.35	1.95
25	FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）	1.94	2.31
26	FJAT-10027（砷芽胞杆菌 *B. arsenicus*）	2.17	2.76
27	FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）	2.56	2.86
28	FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）	2.31	3.1
29	FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）	2.13	3.94
30	FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*）	2.16	4.57
31	FJAT-10009（解凝乳芽胞杆菌 *P. curdlanolyticus*）	2.15	5.1
32	FJAT-10033（强壮芽胞杆菌 *B. fortis*）	1.89	5.38
33	FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）	1.42	6.34
34	FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）	1.96	6.93
35	FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）	2.24	8.1
36	FJAT-14240（韩研所芽胞杆菌 *B. kribbensis*）	2.92	8.91
37	FJAT-14210（韩国芽胞杆菌 *B. koreensis*）	2.08	10.72
38	FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）	2.02	10.77
39	FJAT-8755（深褐芽胞杆菌 *B. atrophaeus*）	1.8	10.96
40	FJAT-14207（澳门芽胞杆菌 *B. macauensis*）	2.04	15.88
41	FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）	1.73	17.14
42	FJAT-8784（枯草芽胞杆菌斯氏亚种 *B. subtilis*）	2.53	17.86
43	FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）	1.94	25.24
44	FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）	2.32	25.3
45	FJAT-14248（马氏芽胞杆菌 *B. macyae*）	2.46	35.31
46	FJAT-14204（浸麻类芽胞杆菌 *P. macerans*）	2.32	42.27

第十一节　芽胞杆菌产纤维素酶特性

一、概述

纤维素酶来源非常广泛，昆虫、软体动物、微生物（细菌、真菌、放线菌等）都能产生纤维素酶，如白蚁、小龙虾等能产生完全不同于其内共生微生物群所产的纤维素酶，反刍动物的瘤胃微生物也拥有强大的纤维素降解酶系。然而，通过微生物发酵方法是进行纤维素酶工业化大规模生产的最有效途径。不同微生物合成的纤维素酶在组成上有着

显著的差异，对纤维素的降解能力也大不相同。其中，放线菌的纤维素酶产量极低；大多数细菌纤维素酶对结晶纤维没有活性，且多为胞内酶或吸附于细胞壁上，分离纯化难度大，但会分泌一种有多种纤维素酶和半纤维素酶组成的纤维小体（cellulosome），此纤维小体具有较高的纤维素水解能力；而丝状真菌具有产酶效率高、酶系结构合理、酶分泌到胞外、易于分离提取、同时可产许多其他酶等优点。目前，用于生产纤维素酶的微生物大多为丝状真菌和少数芽胞杆菌，其中产酶活力较强的菌种有：木霉属（*Trichoderma*）、曲霉属（*Aspergillus*）、青霉素属（*Penicillium*）、枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）、地衣芽胞杆菌（*Licheniformis*）等。早在 20 世纪 50 年代，美国的 Reese 博士从腐烂的纤维材料上分离出来的绿色木霉（*T. virde*）产纤维素酶能力最强，由该菌产生的纤维素酶复合体系具有分解天然纤维素所需要的 3 类酶组分，能协同水解纤维素底物彻底地转化为葡萄糖。

纤维素酶是世界上第三大工业酶（谢敬，2010），其应用极为广泛，几乎渗透到了一切以植物为原料的加工业，如纺织、酿造、果汁与蔬菜加工、造纸、中草药有效成分提取及饲料等众多领域。纤维素酶在禽畜产品养殖中可作为一种外源性水解酶添加到饲料中以提高饲料的消化率和利用率，促进禽畜生长、减少粪便排泄量及防治禽畜消化道疾病，因而饲用酶制剂作为一类高效、无毒性作用和环保型的"绿色"饲料在 21 世纪有着十分广阔的应用前景（陈清华，2011；Kuhad *et al.*, 2011；敖维平和杨正德，2004）。纤维素酶用于饲料添加剂主要在以下几个方面起作用（Campbell and Bedford, 1992；Marquardt *et al.*, 1996）：①补充动物自身内源消化酶的不足，刺激内源酶的分泌，改善消化道酶系组成、酶量及活性，从而提高对营养物质的利用；②破坏植物细胞壁结构，使细胞内营养物质溶解出来，提高饲料的利用率；③消除饲料抗营养因子（anti-nutrition factor，ANF），解除饲料中果胶、半纤维素产生的粘连阻碍，从而促进内源性消化酶的扩散和益生菌群的定殖，增加酶与营养物质的接触面积，提高养分的消化与吸收；自 1975 年美国饲料工业首次将纤维素酶作为饲料添加剂用于配合饲料中，在饲养行业中取得了明显的效果。纤维素酶作为饲料添加剂，在国内饲料行业中迅速发展，每年以 10%～20%的速度递增。大量研究表明，纤维素酶应用于养殖行业日粮中，具有显著的经济效益。高春生等（2006）在草鱼饲料中添加饲料降低了饵料系数，提高了饲料利用率。任继平等（2006）的研究表明：6%的鲁梅克斯 K-1 草粉日粮中添加 0.15%的纤维素酶能提高日粮中干物质、有机物、总能和酸性洗涤纤维素的消化率，并且能提高生长猪前 2 周日增重。韩兆玉等（2008）研究含有纤维素酶的酶制剂对奶牛产奶量和乳品质的影响中发现，添加酶制剂能够明显提高泌乳中期奶牛的产奶量（$P<0.05$），提高乳脂率，并降低牛奶中的体细胞数（$P<0.05$）。国内学者研究过 13 种芽胞杆菌纤维素酶特性，综述如下。

（1）侧胞短芽胞杆菌（*B. laterosporus*）

对一株侧胞短芽胞杆菌（BL2002）产胞外酶（淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶）特性和其抑菌特性进行了初步研究，并对该菌株的产芽胞发酵条件进行优化。酶活鉴别培养基结果显示：BL2002 具有较强的产胞外蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶的能力，透明圈与菌落比各为 3.74、5.89、5.60，但未显示产脂肪酶的能力；采用平板交叉划线法研究其抑菌特性发现菌株 BL2002 对 7 种病原菌（金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、李斯特菌、沙

门氏菌、小肠结肠耶尔氏菌、假单胞菌、肠球菌）有显著的抑制作用；优化后发酵条件为初始 pH7.0、接种量 4%、葡萄糖 2%、蛋白胨 5%、$CaCl_2$ 0.05%、$MnSO_4$ 0.10%，该菌芽胞产量可达 2.39×10^9CFU/ml（张念海等，2011）。

（2）地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）

运用底物筛选法从地衣芽胞杆菌 GXN151 的基因文库中筛选到 3 类表达羧甲基纤维素酶活性的克隆。对克隆 pGXNP11 的测序表明其含有纤维素酶基因 *cel9A* 和 *cel48A* 的部分序列，*cel9A* 基因为 1899bp，可编码含 633 个氨基酸的内切葡聚糖酶 Cel9A，Cel9A 的 N 端第 21～456 位氨基酸形成家族 9 糖基水解酶催化功能域，第 480～565 氨基酸为家族 3 碳水化合物结合组件功能域；*cel48A* 基因位于 *cel9A* 基因的下游，两者可能共用一个操纵子。*cel48A* 基因编码一个外切纤维素酶，通过染色体步移法将 *cel48A* 定位于 4kb *Eco* RⅠ片段上或 10kb *Sal*Ⅰ片段上（张杰等，2004）。地衣芽胞杆菌 GXN151 的 *cell2A* 基因为 783bp，可编码含 261 个氨基酸的羧甲基纤维素酶 Cel12A，Cel12A 的 N 端第 1～28 氨基酸具典型的信号肽特征、第 9～31 位氨基酸具跨膜功能域特征、第 104～261 位氨基酸形成家族 12 糖基水解酶（glycosyl hydrolase）功能域。将编码其第 73～261 位氨基酸的 DNA 序列克隆到大肠杆菌表达载体 pET-30a（+），得到表达质粒 pGXNl2A，用 1mmol/L IPTG 诱导处理 JM109（DE3）/pGXN12A 的培养液，6h 时 pGXN12A 的表达量达最高，在 JM109（DE3）和 BL21（DE3）pLysS 中该表达蛋白质可分别占菌体胞内总蛋白质的 54.3%和 20.9%。在含羧甲基纤维素的 LA 平板上 JM109（DE3）/pGXN12A 和 BL21（DE3）pLysS/pGXN12A 表现有较弱的羧甲基纤维素酶活性，说明重组的 Cel12A 的催化功能域具有独立的催化活力，GXN12A 在 JM109（DE3）中的表达产物大部分形成不溶性包涵体（刘永生等，2003）。对地衣芽胞杆菌 LCB-8 进行紫外诱变，以提高其产淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的能力。利用紫外线进行诱变，并对诱变株淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的活力进行定性和定量测定。当紫外诱变的时间为 30s 时，菌落的致死率达 72.4%，因此紫外线照射诱变最佳时间为 30s。经初筛和复筛，得到 2 株较好的诱变株。其中，菌株 DY-97 的淀粉酶酶活提高 150%，蛋白酶酶活提高 78%，纤维素酶酶活提高 17%；菌株 DY-34 的纤维素酶酶活提高 31%，淀粉酶酶活提高 46%，蛋白酶酶活提高 64%。通过诱变筛选得到的菌株 DY-97 可用于含蛋白质和淀粉较多的饲料发酵，而菌株 DY-34 可用于含纤维素较多的饲料发酵（吕志伟等，2011）。通过优化该菌产酶条件，以期在饲料中的进一步应用建立基础。纤维素酶活性用还原糖法测定，产酶条件采用单因素筛选与正交优化方法相结合。培养基初始 pH6.5、培养温度 37℃、接种量 2%、250ml 三角瓶装液量 30ml、葡萄糖 1.5%、羧甲基纤维素钠 0.5%、酵母膏 1.5%、KH_2PO_4 0.05%、NaCl 0.5%，培养 48h 后酶活性达最高 3.45U/ml；K^+、Mn^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Na^+对产酶有激活作用，Cu^{2+}则抑制酶活性。酶活性比出发菌提高约 1.4 倍，对在饲料制作中提高纤维降解具有一定的实用价值（詹发强等，2009）。通过测定发酵过程中发酵液的纤维素酶活、半纤维素酶活、可溶性总糖和还原糖浓度，以及底物残渣质量、残渣结晶度、傅里叶红外光谱和表面结构的变化来研究地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis* X18）对麦麸的降解作用。发现在发酵过程中此菌体产酶的过程也就是木质纤维素的降解糖化过程。上清液中的纤维素酶酶活和半纤维素酶酶活分别在发酵进行到 96h 和 48h 时达最高

峰。发酵液中总糖和还原糖含量分别于4h和48h达最高值5257.79mg/L和1363.94mg/L，然后下降到一定程度后保持恒定。底物残渣傅里叶红外光谱分析表明，此菌株对麦麸中的纤维素、半纤维素和木质素都有不同程度的降解，但以纤维素降解为主。纤维素、半纤维素和木质素的降解率分别为37.03%、15.86%和17.03%。利用扫描电镜对底物残渣表面结构进行观察，可看到该菌株主要降解麦麸内表面蜂巢结构边缘骨架中起支撑作用的成分（燕红和杨谦，2007）。分别接种地衣芽胞杆菌、植物乳杆菌、酿酒酵母1.0×10^6CFU/g，对饲料进行厌氧发酵5d，第5天地衣芽胞杆菌、植物乳杆菌、酿酒酵母分别为1.26×10^9 CFU/g、1.59×10^7CFU/g和7.94×10^8CFU/g，pH4.52，纤维素酶和蛋白酶活性分别为22.4U/g和224U/g，小肽含量为9.8mg/L，总氨基酸含量提高了12.69%（张玉辉等，2010）。用PCR、酶切、连接方法将地衣芽胞杆菌耐高温α-淀粉酶基因（*amy*）表达单元（包括启动子、信号肽及淀粉酶基因）克隆到pHY300PLK中，并用反向PCR、同源重组方法，去除重组质粒的氨苄抗性基因，以利用α-淀粉酶基因的启动子和信号肽高效表达自身蛋白质及外源蛋白质。结果表明：连入了α-淀粉酶基因的pHY300PLK，即pAMY质粒能够分泌表达α-淀粉酶，且去除了氨苄抗性基因的pAMY质粒，即pAMY1质粒能更有效地表达α-淀粉酶；将纤维素酶基因连接到pAMY1质粒中淀粉酶信号肽的下游，得到的重组质粒pCEL能分泌表达纤维素酶，表明α-淀粉酶基因的启动子和信号肽不仅能启动自身蛋白质的表达，也能启动外源蛋白质的表达；重组菌的生长情况与质粒拷贝数的比较表明，与pAMY质粒相比去除了氨苄抗性基因的pAMY1质粒对重组菌的生长没有影响，且pAMY1质粒在重组菌的复制效率更高，能更高效地表达蛋白质，以上结果证明pHY300PLK克隆质粒已成功改造成表达质粒，下一步可用于更多外源基因的分泌表达（覃君君等，2013）。从广西大学农场陈旧稻草堆中分离出一株具有降解天然纤维素稻草粉、甘蔗渣粉活性的细菌GXN151，经形态观察、16S rDNA序列分析和丙酸盐利用试验将其鉴定为地衣芽胞杆菌。通过连接经*Bam*HⅠ酶切的pBluescript KS（+）和回收得到的经*Sau*3AⅠ部分酶切的GXN151的3～10kb DNA，在大肠杆菌JM109中构建了该菌的含7099个克隆的基因文库，克隆文库中插入片段最大的为11.0kb，最小的为3.1kb，平均大小为4.6kb，含GXN151基因组中任一基因的概率为99.6%。筛选该文库获得8个表达羧甲基纤维素酶活性的克隆，DNA测序和PCR分析表明，该8个克隆可归为3类不重叠的独立克隆，其中一个克隆pGXNL2的测序分析表明其上的*cel5A*基因为1626bp，可编码含542个氨基酸的羧甲基纤维素酶，Cel5A的N端42个氨基酸具有信号肽特征，它的第66～321位氨基酸为家族5糖基水解酶功能域、第391～472位氨基酸为家族3碳水化合物结合组件（carbohydrate-binding module，CBM），这是首次报道地衣芽胞杆菌能降解结晶纤维素及从该种细菌中克隆到纤维素酶基因（刘永生等，2003）。以树叶为原料，利用地衣芽胞杆菌发酵产纤维素酶降解树叶中纤维素，提高树叶饲料的利用率。为优化地衣芽胞杆菌发酵产酶的培养基，选取碳源（玉米面）、氮源（硫酸铵）、K_2HPO_4 3个因素进行中心组合设计，采用响应面法优化产酶培养基，提高纤维素酶活性。结果表明：最佳培养基组成为玉米粉0.84%、硫酸铵1.79%、K_2HPO_4 0.14%、地衣芽胞杆菌产纤维素酶活性为6.73U（王巍杰等，2012）。通过测定发酵过程中发酵液的纤维素酶活性、半纤维素酶活性、可溶性总糖和还原糖浓度，以及底物残渣质量、残渣结晶

度、傅里叶红外光谱和表面结构的变化来研究地衣芽胞杆菌对稻草的降解作用。研究发现，在发酵过程中地衣芽胞杆菌菌体产酶过程也就是木质纤维素的降解糖化过程，总糖含量于第 4h 达最高值，然后下降到一定程度后保持恒定；还原糖含量随发酵进行不断下降，达一定值后保持恒定；该菌株对稻草长达 5d 的降解过程中结晶度未发生明显变化，利用扫描电镜对底物残渣表面结构进行观察，可看到该菌株主要降解稻草的薄壁细胞，使其发生严重皱缩（燕红和杨谦，2007）。为探究混合菌种最佳发酵工艺，以制备优良动物饲料，试验选取纤维素酶产生菌——地衣芽胞杆菌 D50 对槐树叶中纤维素进行降解，再添加乳酸菌进行二次发酵。通过单因素试验确定混合菌种发酵工艺、发酵培养基及最优发酵方式。结果表明：乳酸菌可利用一次发酵后的剩余营养物质进行二次发酵，乳酸菌二次发酵时间为 24h，发酵后 pH 为 5.65，乳酸含量最大为 2.93%，两次发酵总时间为 72h（杨永强等，2012）。从云南亚麻沤麻水、种植土、沤麻残渣堆积土中粗筛获得具有果胶酶活性的菌株 51 株，通过几种酶活性测定，获得果胶酶和木聚糖酶（主要的半纤维素酶）活性较高、无纤维素酶活性且脱胶周期短的目的菌株 4 株。基于 4 个菌株的果胶分解能力、沤麻周期长短及沤麻的效果等指标，最终确认 YN1.1 是优良的亚麻脱胶菌株，经 16S rRNA 基因测序和生理生化鉴定，该株菌为芽胞杆菌属的地衣芽胞杆菌（吴丽艳等，2007）。

（3）解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）

从造纸污泥中分离到一株芽胞杆菌 ZA-05，该菌具有内切 β-1,4-葡聚糖酶活性，且在碱性条件下酶活较高，经生理生化和分子生物学鉴定，该菌株为解淀粉芽胞杆菌；根据 GenBank 登录的内切 β-1，4-葡聚糖酶基因（DQ782954.1、M28332.1、AY859492.1）的同源性序列，利用 PCR 方法克隆到该菌株的功能基因，并对其进行测序。测序结果显示其全长为 1500bp，推测其含 499 个氨基酸（魏艳丽等，2011）。

（4）短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）

从一株产碱性纤维素酶的短小芽胞杆菌 H12 中克隆了编码 β-1,4-葡聚糖内切酶的基因，对其基因序列及其酶的结构域进行了分析预测，同时将该酶的基因构建于大肠杆菌表达载体 pET20b 中，获得重组表达载体 pET20b-EglA，将其转化至大肠杆菌菌株 BL21（DE3）中进行表达。结果表明，该基因大小为 1980bp，共编码 659 个氨基酸；对 β-1,4-葡聚糖内切酶结构域分析表明，该酶由两个不连续的结构域组成，其一为 N 端催化结构域，由糖基水解酶家族 9 组成，其二为 C 端底物结合结构域，由碳水化合物绑定结构域家族 3 组成；平板实验结果表明，β-1,4-葡聚糖内切酶基因在重组大肠杆菌中得到了良好的分泌表达；SDS-PAGE 电泳图谱表明该酶的分子大小约为 73kDa（郭成栓等，2010）。为了确定短小芽胞杆菌（*B. pumilus* S12）产碱性纤维素酶的最适发酵条件，采用液体摇瓶的发酵方法，进行最适发酵条件的单因素试验和正交试验。结果表明，*B. pumilus* S12 菌株合成纤维素酶的最适碳源为 CMC 和麸皮，最适氮源为酵母膏，有机氮比无机氮更有利于产酶；最适产酶条件为起始 pH8.5，培养温度 32℃，装液量为 250ml 三角瓶装入 70ml 培养液，接种量为 3%，在此条件下发酵 20h，酶活性可达 367.9μg/ml（黄谚谚等，2012）。从土样中分离碱性纤维素酶高产菌株，利用 CMC 平板初筛，然后利用摇瓶复筛，筛选酶活性高的菌株，对分离出的一株高产菌株进行了鉴定并对其所产酶进行了酶

谱分析。获得一株碱性纤维素酶高产菌株 H12，酶活性达 1.96U/ml。该菌株呈长杆状，革兰氏染色为阳性，产芽胞；16S rDNA 基因序列为 1419bp，与短小芽胞杆菌 16S rDNA 基因序列具有最高的同源性，基于 16S rDNA 基因序列的同源性分析及系统发育分析等方面的多相分类研究，鉴定菌株 H12 为短小芽胞杆菌；碱性纤维素酶的酶谱分析只有一条水解条带，酶分子质量在 75kDa 左右（郭成栓等，2011）。对从土样中分离得到的一株碱性纤维素酶高产菌株 H9 进行了鉴定，该菌株呈长杆状，革兰氏染色为阳性，产芽胞。通过对其形态、生理生化特性、16S rDNA 基因序列（该序列已收录于 GenBank，登录号为 EF501974）同源性分析的多相分类研究，确定该菌株为短小芽胞杆菌。对酶的性质研究表明，其最适 pH 为 8，最适温度为 55℃，在 pH5～9 时具有良好的稳定性（郭成栓等，2007）。

（5）蜂房类芽胞杆菌（*P. alvei*）

从土壤中筛选出一株产纤维素酶的蜂房类芽胞杆菌，利用甘蔗渣固态发酵生产木聚糖酶。最佳的固态发酵条件为：酵母膏 0.2%、麸皮 20%、蔗渣 80%，加入其干重 4 倍的水，发酵温度为 32℃，pH 为 8.5，最大酶活可达 1213U/g（吴凌伟等，2003）。

（6）耐盐芽胞杆菌（*B. halodurans*）

碱性纤维素酶是重要的洗涤剂添加剂，不仅可以去除衣物上的污渍，还可以软化衣物和增加衣物的鲜艳度。嗜碱芽胞杆菌是生产碱性纤维素酶的主要菌种。郭成栓等（2007）概述了其编码的碱性纤维素酶的性质，编码酶的基因，基因的克隆、表达及作为洗涤剂添加剂的去污机理，指出了今后的研究方向。迄今报道的绝大多数纤维素酶的最适 pH 都在酸性和中性范围，当添加到洗涤剂中，由于处于碱性环境而无活力，不能发挥作用，近年来，国内外对由耐盐芽胞杆菌产生的碱性纤维素酶（CMCase，endo-β-1,4-glucanase，EC3.2.1.4）进行了广泛的研究。对该酶产生菌株的筛选和培养条件、酶学性质，以及该酶基因的克隆和表达等方面的研究进行综述；并对我国目前未能实现该酶工业化的原因进行了初步分析，并提出解决途径（高红亮和杨雪霞，2002）。筛选到一株高产 β-1,4-聚糖酶芽胞杆菌 A-30，采用麸皮为主要碳源，尿素为主要氮源，在 pH8.5、温度 32℃时发酵 60h，最高木聚糖酶酶活可达 460IU/ml，纤维素酶酶活最高可以达 1.21IU/ml。Fe^{3+}、Fe^{2+}、Al^{3+}可以促进纤维素酶的合成，而 Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Hg^{2+}则起抑制作用。多数的氨基酸可以在很大程度上促进 β-1,4-聚糖酶的合成（陈士成等，2000）。

（7）解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）

以内生解淀粉芽胞杆菌 TB2 基因组为模板，克隆了该菌的 β-1,4-内切葡聚糖酶基因的 ORF。测序结果表明，该 ORF 全长 1500bp，编码 499 个氨基酸，分子质量为 55.07ku，等电点为 7.83。Blast 同源性分析结果表明，该序列与 GenBank 登录的一株枯草芽胞杆菌（*B. subtilis* M28332）纤维素酶核苷酸序列的同源性最高（98%），其氨基酸同源性也达 98%。用 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切目的片段和表达载体 pET-29a（+）相连接后，构建重组表达载体 pET-glu，并导入菌株 BL21 中表达。酶学特性表明：SDS-PAGE 在 59ku 左右有融合蛋白带，该酶的最适反应温度为 50℃，最适反应 pH 为 6.4，为中性纤维素酶。实验结果为进一步研究内生解淀粉芽胞杆菌 TB2 纤维素酶的功能和应用打下了基础（范晓静等，2008）。随着人们对农产品品质和安全性要求的提高，高效生物防治资源的筛

选显得尤其重要。本研究通过平板对峙实验、分子鉴定、刚果红染色、葡聚糖酶基因克隆与序列分析等方法获得一株抑制多种植物病原真菌的芽胞杆菌，编号为 YW26。16S rDNA 基因序列分析表明，该菌株为解淀粉芽胞杆菌；刚果红染色显示该菌株具有很强的产纤维素酶能力；根据 GenBank 数据库中芽胞杆菌内切葡聚糖酶基因（CP000560）序列设计引物，克隆得到 1527bp 的片段，经测序、Blast 分析显示该片段与 *B. amyloliquefaciens* FZB42 内切 β-1,4-葡聚糖酶基因序列同源性为 99%。该解淀粉芽胞杆菌抑菌效果显著，具有较强产纤维素酶能力。因此，该菌株可作为一种生防资源，开发新的生防制剂（吴慧玲等，2012）。对基因工程菌 pHBM-End 培养条件优化的研究结果表明：250ml 三角瓶中装入 50ml LB 培养基（含有 10μg/ml Tet），按 5%的接种量接种种龄为 12h 的液体种子，培养 4h 后加入终浓度为 0.2%的木糖进行诱导，9h 后上清液中酶活可达 889U/ml，是初发菌株 C-36（79.2U/ml）的 11.22 倍（韩学易等，2008）。为了解决纤维素酶发酵工业产量低、生产成本高等问题，加快纤维素酶工业化应用的步伐。采用 5L 发酵罐，利用响应面法（RSM）对基因工程菌 WH320-pHIS1525-G7 从接种量、木糖流速及流加时间进行产酶优化。确定其发酵工艺为：17.62%的接种量，温度 37℃，pH7.0，罐压 0.03～0.05MPa，转速 300r/min，0.41g/（L·h）的速度流加木糖 11.33h，发酵过程中控制溶氧浓度≥30%。在该发酵条件下测得纤维素酶活性为 2.152U/ml，比优化前摇瓶发酵酶活性提高了 2 倍，可为工业化生产纤维素酶提供依据（韩学易等，2013）。

（8）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）

研究从五粮液包包曲中筛选出 5 株芽胞杆菌，使用透明圈法测定 5 株具有产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的能力，并按《伯杰氏系统分类手册》（第八版）和《常用细菌系统鉴定手册》对菌株进行鉴定，结果显示，5 株菌均为枯草芽胞杆菌（赵东等，2010）。从草鱼肠道分离出一株枯草芽胞杆菌，有较强的活性。该菌产生的纤维素酶粗酶液，经盐析、透析，并通过葡聚糖凝胶层析柱 Sephadex G-75 分离纯化，经 SDS-PAGE 后表明第 2 峰已纯化，得到一种分子质量约为 62.43kDa 的纤维素酶。分离纯化后该酶的比活力提高了 2.924 倍，回收率为 6.38%。酶学试验研究表明：该酶的最适反应温度为 55℃，最适 pH 为 7.0；Lineweaver-Burk 法求得动力学参数，K_m 和 v_{max} 分别为 1.02×10^{-3}g/ml、2.727×10^{-2}mg/（ml·min）（贺刚等，2008）。从江苏淮安土壤中分离出一株产耐热纤维素酶的细菌，将其命名为 H3，经菌种鉴定试剂盒初步鉴定为枯草芽胞杆菌，最适反应 pH 为 5.5，Cu^{2+}、Mn^{2+}对酶活性有一定的激活作用，Mg^{2+}、Zn^{2+}对酶活性有一定的抑制作用。该研究为降低纤维素酶生产成本及推动生物质乙醇的发展提供了科学依据（游庆红和尹秀莲，2010）。筛选耐热性纤维素降解细菌菌株，进行鉴定并研究其酶学特性。采用刚果红法从腐烂秸秆与腐殖质土壤样品中分离纤维素降解菌，通过形态学观察与 16S rRNA 序列分析鉴定其种属，并对该纤维素酶进行酶学性质研究。筛选到一株纤维素酶活性高的菌株 NP29，经鉴定该菌株为芽胞杆菌属（*Bacillus*）微生物。对该菌所产纤维素酶酶学特性的研究表明，该酶反应的最适 pH 为 4.5，最佳反应温度为 65℃，具有良好的 pH 稳定性和热稳定性。在 37℃、pH7.0 的条件下，该菌株在发酵 36h 后纤维素酶活性可达 1.8U/ml，且产酶量与细菌生长密切相关（杨丽娜等，2012）。从近海土壤中分离一株产纤维素酶的菌株，经形态和生理生化指标鉴定为枯草芽胞杆菌。对产酶菌株经

碳源、氮源、金属元素、培养温度、pH 和接种量进行优化，确定最佳培养组分和条件为：20g/L 葡萄糖、10g/L 胰蛋白胨、3g/L K_2HPO_4、3g/L NaH_2PO_4、2g/L 氯化铁，pH6.5，培养温度 32℃，优化后纤维素酶系中以羧甲基纤维素酶活性最高，为 72.37U/ml，其次是 β-糖苷酶和微晶纤维素酶（程仕伟等，2013）。以产纤维素酶的枯草芽胞杆菌 C-36 为研究对象，从碳源、氮源、接种量、培养基初始 pH、温度等方面研究该菌株的产酶条件，结果表明该菌产酶的最适碳源为 2%的 CMC-Na，最适氮源为 2.5%的蛋白胨+酵母粉复合氮源，最佳接种量为 4%，最适起始 pH 为 5.0，产酶最适温度为 37℃。在此条件下，培养 36h 后达产酶高峰，CMC 酶活为 196.33U/ml，是优化前的 3 倍（韩学易等，2006）。采用单因素设计，对枯草芽胞杆菌的碳源、氮源、起始 pH、盐浓度和培养时间进行优化，测定菌液的纤维素酶活性。结果表明：碳源是葡萄糖时，酶活性 0.750，纤维素酶活性最高；氮源是蛋白胨时，酶活性 0.711，纤维素酶活性最高；起始 pH 为 7 时，酶活性 0.696，纤维素酶活性 0.698，纤维素酶活性最高；培养时间 18h，酶活性 0.698，纤维素酶活性最高（刘加合，2012）。从江苏省句容市水稻植株叶片表面分离到的一株枯草芽胞杆菌 7Ze3，能够产生表面活性素（surfactin）和伊枯草菌素（iturin A）等抗菌活性物质，表现出较好的平板拮抗效果，同时还具有产纤维素酶、葡聚糖酶、蛋白酶和嗜铁素的活性，显示其具有较出色的生物防治利用潜力。对其脂肽类抗生素以外的次生代谢产物进行了进一步研究，经多批次（总体积 40L）发酵、乙酸乙酯萃取，浓缩得到约 46g 粗提物，用硅胶吸附柱层析和右旋葡聚糖凝胶柱层析，并结合反相 HPLC，从中分离到 5 种化合物。通过电喷雾质谱和质子核磁共振分析，鉴定它们均为环二肽类化合物，结构分别为环亮氨酸-脯氨酸、环苯丙氨酸-脯氨酸、环缬氨酸-亮氨酸、环苯丙氨酸-异亮氨酸、环苯丙氨酸-苯丙氨酸。本研究首次从陆地生境的枯草芽胞杆菌中分离到环二肽类化合物（李海峰等，2010）。枯草芽胞杆菌 C-36 纤维素酶经硫酸铵、Sephadex G-75、Sephadex G-100 分离纯化后，得到一个电泳纯的葡聚糖内切酶。SDS-PAGE 结果表明，该酶分子质量约为 35kDa。最适反应温度和 pH 分别为 65℃和 6.8，Zn^{2+}、Pb^{2+}、Fe^{3+}对酶有抑制作用，Ba^{2+}、Fe^{2+}对酶有激活作用，在 50℃、pH6.8 条件下，酶对 CMC-Na 的米氏常数 K_m 为 0.34g/L，最大反应 v_{max} 为 0.17mg/（min·ml）（胥兵等，2006）。通过测定枯草芽胞杆菌 CS16 的抑菌活性，对其胞外代谢物活性与成分进行分析，以期开发有效的生防菌剂。结果表明：菌株 CS16 对多株植物病原真菌具有明显的抑制作用，对病原细菌的抑菌作用相对较弱，菌株 CS16 发酵液中羧甲基纤维素酶、淀粉酶和木聚糖酶活性分别为 509.58U/ml、7198.71U/ml 和 1853.68U/ml；其发酵液经酸沉淀所得粗提物可明显抑制香蕉枯萎病菌丝生长，最小抑菌浓度为 0.0625mg/ml；利用反相硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱和正相硅胶柱分离纯化获得较纯的抑菌物质，经薄层层析和 HPLC 定性分析，初步认为其胞外抑菌物质中含有 iturin A（李占飞等，2013）。为研究枯草芽胞杆菌 J-4 制剂对肉鸡肠道消化酶活性、常规营养成分及消化性能的影响，选用 4 日龄肉仔鸡 3000 只，随机分成试验组和对照组，对照组饲喂基础日粮，试验组 4～21 日龄饲喂添加 0.1% J-4 菌剂的基础日粮，之后停止饲喂 J-4 菌剂。测定肉仔鸡日增体重、料重比、粪便中消化酶活性及常规有机营养成分含量。结果显示，饲料中添加 0.1%的 J-4 菌剂，可使肉鸡的平均日增体重提高 11.99%，料重比降低 11.03%，试验组粪便中 α-淀粉酶、蛋白酶、

脂肪酶、纤维素酶的平均活力比对照组分别提高 39.82%、31.56%、44.60%、45.30%，停止饲喂 J-4 菌剂后，试验组粪便中消化酶活性、常规有机营养成分含量及料重比等指标又逐渐接近对照组。表明 J-4 菌剂具有提高肉鸡肠道消化酶活性、提高饲料转化率、改善肉鸡生产性能的作用（刘涛等，2013）。试验主要对目前饲料领域应用广泛的枯草芽胞杆菌进行产纤维素酶能力筛选及发酵优化条件的研究，为枯草芽胞杆菌 Pab02 开发成微生态制剂及生产纤维素酶提供理论依据。通过羧甲基纤维素钠培养基筛选分离到具有产纤维素酶能力的枯草芽胞杆菌 Pab02。通过分析初始 pH、发酵温度和发酵时间对枯草芽胞杆菌 Pab02 产纤维素酶活性的影响，得出最佳初始 pH 为 8.0、发酵温度为 37℃、发酵时间为 48h。在该条件下发酵液酶活达 358.751U/ml 酶液，比优化前提高了 2.1 倍（祝小等，2007）。从池底污泥中分离一株芽胞杆菌，经菌落形态及主要生理生化特性鉴定为枯草芽胞杆菌。对此菌发酵过程中产酶情况进行研究，结果表明，菌株能够分泌淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶，具有用于研制微生态制剂的潜力（胡德朋等，2008）。以产植酸酶枯草芽胞杆菌（A5）复合诱变的再生突变株 Z56 和产纤维素酶枯草芽胞杆菌（B6）复合诱变的再生突变株 X57 为亲本，利用双亲灭活原生质体融合技术进行种内融合，构建可同时产植酸酶、纤维素酶的工程菌。结果表明，从构建的 385 个融合子中筛选到 6 株两种酶活性相对较高的工程菌，其中菌株 R4、R5 的纤维素酶产量高于亲本，植酸酶产量也相对较高；粗酶液用 90℃处理 10min 后，纤维素酶剩余酶活分别为对照的 62%和 58%，植酸酶剩余酶活分别为对照的 73%和 71%（谢凤行等，2010b）。试验研究枯草芽胞杆菌对肉鸡日粮粗纤维消化率的影响。选用 1 日龄 AA 肉仔鸡 96 只，随机分为 4 组（对照组和试验 1 组、2 组、3 组），每组 3 个重复，每个重复 8 只鸡。对照组每 10 日灌服乳杆菌培养液 400μl，试验组每 10 日分别口腔灌服乳杆菌和枯草芽胞杆菌菌液 200μl、300μl、400μl。结果表明，后期（21～40d）对饲料粗纤维的消化率均有显著影响（$P<0.05$）。试验结果表明，口腔灌服 400μl 菌液效果最好，产纤维素酶枯草芽胞杆菌既能表达纤维素酶，又对动物有益生菌的作用，所产的纤维素酶特异性地降解纤维素，从而对饲料粗纤维的消化率具有显著提高作用（李旺等，2013）。枯草芽胞杆菌是一种高效的外源蛋白表达菌株，能将目的蛋白分泌到细胞外的培养基中。从福寿螺胃液共生菌株 *Bacillus* sp. strain AC-1 基因组中克隆纤维素酶 EGA 的基因序列，利用基因工程技术构建纤维素酶 EGA 的重组枯草芽胞杆菌表达载体 pAUsp-ega。该载体含有一个强启动子和一段信号肽，表达得到的重组纤维素酶 EGA 以羧甲基纤维素钠（CMC-Na）为底物，得到的培养基上清酶活性达 1120U/L。该纤维素酶在 pH6.0 表现最大水解活力，最适反应温度为 60℃，在酸性条件下稳定性良好（张漫莉等，2013）。研究旨在利用响应面法对实验室分离并保存的枯草芽胞杆菌 NP29 进行产纤维素酶的发酵条件优化。首先用 Plackett-Burman 设计从 9 个发酵因素筛选出主要影响菌株 NP29 产酶的因素，然后进行最陡爬坡试验逼近最佳响应面区域，最后通过 Box-Behnken 响应面法试验，得到最适发酵条件。结果表明，淀粉含量、培养温度和接种比例对该菌株纤维素酶产量影响较大。在淀粉含量、接种比例、培养温度分别为 21.44g/l、1.88%、41.07℃条件下培养 36h，发酵液测得的酶活为 4.278U/ml，较优化前的 2.021U/ml 提高了 111.68%。响应面法可以快速、有效地对菌株 NP29 产纤维素酶发酵条件进行优化，该方法在纤维素酶工业生产中

具有重要作用（杨丽娜等，2012）。王炜和付建红（2002）引进一株产纤维素酶的枯草芽胞杆菌，通过超声波细胞破碎的方法，确定该菌所产纤维素酶为胞外酶。采用麸皮为碳源，蛋白胨和硫酸铵为复合氮源，37℃，220r/min 摇瓶发酵 48h，最高酶活达 6.99U/ml。研究从西双版纳采集的 10 份土壤样品，用自行设计的选择培养基，37℃恒温培养 72h，分离到 18 株产纤维素酶的细菌菌株。经过复筛，得到纤维素酶活性较高的产酶菌株 YN5。通过对其形态、生理生化特性研究，将菌株 YN5 初步鉴定为枯草芽胞杆菌。对酶的性质研究表明，其最适 pH 为 5.0，最适温度为 60℃，在 pH4.0～7.0 时具有良好的稳定性（石笛等，2009）。采用刚果红平板法从津巴布韦醇化片烟上筛选纤维素降解菌，根据形态学、生理生化特征及 16S rRNA 核酸序列对所筛菌株进行鉴定，并对其酶学性质和片烟降解进行研究。初步鉴定结果表明：所筛得产纤维素酶活性较高的菌株 C-11 属于枯草芽胞杆菌，该菌株所产纤维素酶催化最适温度为 50℃、最适 pH 为 7.0。Fe^{3+}和 Ca^{2+}对酶活性有促进作用，Mg^{2+}对酶活性影响较小，而 K^{+}、Co^{2+}、Zn^{2+}、Na^{+}对酶活性有不同程度的抑制作用。该菌株所产纤维素酶降解片烟中纤维素的最适温度为 50℃，最适时间为 2h，片烟中的纤维素失重率达 41.23%（王莹等，2011）。以羧甲基纤维素钠（CMC-Na）为唯一碳源，首次从被微生物蚕食的柠檬叶样品上，筛选得到一株对木质纤维素具有明显降解效果的细菌，通过形态学和分子生物学研究，鉴定其为枯草芽胞杆菌，命名为 L13；并研究了温度和 pH 对菌株产酶的影响。结果表明，在 pH 为 5.0、50℃的最佳产酶条件下，CMCase 酶活最高达 5.21U/ml。对扩大纤维素降解微生物的筛选和应用范围具有重要意义（刘洁丽等，2010）。家畜饲料工业中生产的商品酶制剂的微生物源基本相似，但由于所选择的微生物种属、底物及培养条件不同，酶的种类和所产生的活性有很大的差异。商品酶产品相对来说是经浓缩和纯化的，含有特定的酶，并有一定的活性，通常不含活细胞。反刍动物日粮中的酶产品来自真菌（主要是长柄木霉、黑曲霉和米曲霉）和细菌（主要是枯草芽胞杆菌）（刘芳和潘晓亮，2007）。采用紫外诱变、化学诱变（DES 诱变）及复合诱变的方法对产纤维素酶枯草芽胞杆菌 B6 的原生质体进行诱变，选育出 10 个高纤维酶活突变株。摇瓶发酵实验结果表明，所选突变株酶活都显著高于菌株 B6，其中，紫外诱变处理的突变株 Z12、化学诱变得到的突变株 H1 及复合诱变处理的突变株 F12 的产酶能力相对较强，且产酶能力稳定，酶活值分别为 448.3U/ml、450.9U/ml、491.8U/ml，分别为对照的 76%、178%、194%。实验结果说明，对枯草芽胞杆菌的原生质进行诱变可以提高菌株产纤维素酶的能力，而原生质体的复合诱变可提高诱变效应（谢凤行等，2010a）。

（9）蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）

为了研究一株蜡状芽胞杆菌 X10-1-2 对稻草的降解作用，测定了发酵过程中发酵液的纤维素酶和半纤维素酶酶活、可溶性总糖、还原糖浓度，以及底物残渣重、残渣结晶度、傅里叶红外光谱和表面结构的变化。研究发现在发酵过程中蜡状芽胞杆菌菌体产酶的过程也就是木质纤维素的降解糖化过程，上清液中的纤维素酶酶活和半纤维素酶酶活分别在发酵进行到 8h 和 20h 时达最高峰；总糖含量于 4h 达最高值，然后下降到一定程度后保持恒定；还原糖含量随发酵进行不断下降，达一定值后保持恒定。该菌株对稻草长达 5d 的降解过程中结晶度变化十分显著，第 3 天时达最高峰，而后又迅速下降。此菌株对稻草中各组分都有一定降解，其中纤维素、半纤维素和木质素的降解率分别为 3.35%、0.91%和 2.81%。

该菌株主要降解稻草的薄壁细胞，使薄壁细胞发生严重皱缩，这预示，该菌株在造纸工业具有良好的应用前景（燕红和杨谦，2008）。从土壤中筛选出一株产纤维素酶的细菌，编号 X10-1-2。该菌株为革兰氏阳性杆菌，可生成芽胞，好氧。最高生长温度为 35～45℃，最低生长温度为 10～20℃。在实验室根据其个体形态、菌落形态、生理生化特征作为分类依据，鉴定为蜡状芽胞杆菌（燕红和杨谦，2007）。分离堆肥中具有产纤维素酶酶活的菌株并进行鉴定，同时进行该菌株纤维素酶酶特性的研究。采用刚果红平板法进行筛选得到菌株，利用 16S rDNA 通用引物对其基因组 DNA 进行扩增，测序得到菌株 GCH-1 的部分 16S rDNA 序列，经 Blastn 调出与菌株 16S rDNA 同源的序列，用软件 Mega 4.0 按照 Neighbor-Joining 方法构建 16S rDNA 系统发育树，并采用 DNS 法测定所产纤维素酶酶活。菌株 GCH-1 的生理生化指标与蜡状芽胞杆菌理化指标相符，与 *B. cereus* IAM 12605（T）处于同一分支，相似性为 99.8%。菌株 GCH-1 发酵 48h 能达最大产酶量，所产纤维素酶在 40℃有最高酶活性，酶活性为 0.581U/ml，菌株 GCH-1 产生的纤维素酶酶系在 pH7.0～9.0 能够保持较高的相对酶活性。菌株 GCH-1 初步鉴定为蜡状芽胞杆菌，能够产胞外纤维素酶（葛春辉等，2009）。

（10）软化芽胞杆菌（*B. macerans*）

用紫外线、硫酸二乙酯（DES）、He-Ne 激光诱变和 UV+DES 复合诱变，对一株产碱性纤维素酶的软化芽胞杆菌 IS-B 进行诱变育种，获得产酶能力是初发菌株 5 倍且产酶性能稳定的高产菌株 IS-B4。采用单因素分析和正交试验对其发酵培养基进行优化，优化后培养基配方：蔗糖 2%、酵母膏 2%、NaCl 0.5%、KH_2PO_4 0.1%。在温度 36℃，pH9.0，接种量 5%，250ml 三角瓶装液量为 60ml 的发酵条件下，酶活性可达 56.0U/ml（肖黎明等，2008）。

（11）嗜碱芽胞杆菌（*B. alcalophillus*）

从贵州、云南、海南、安徽、四川、辽宁等地采集碱性土样，分离筛选到一株能稳定产生碱性纤维素酶的嗜耐盐芽胞杆菌 AH-8。研究表明，该菌株最适产酶温度为 37℃，最适发酵时间为 36h；采用均匀设计法对其发酵培养基进行优化，优化培养基配方：淀粉 3.0%、胰蛋白胨 1.5%、牛肉膏 1.5%、葡萄糖 0.3%、KH_2PO_4 0.1%，初始 pH10.0。在优化培养基条件下，其产酶量提高了 120%。碱性纤维素酶最适反应温度为 60℃，最适反应 pH10.0，0.01% Co^{2+}对酶活性有一定激活作用（周丽娜等，2006）。

（12）嗜热嗜脂肪地芽胞杆菌（*G. stearothermophilus*）

对从高温堆肥中分离得到的一株产胞外耐高温纤维素酶的细菌进行了生理生化鉴定，结果显示其属于嗜热脂肪芽胞杆菌。对其所产纤维素酶进行了分离纯化，该酶反应的最适温度约为 66℃，最适 pH 为 7.0，至少有 8 个亚基（贺芸，2006）。阿维菌素生产过程中会产生大量废弃药渣，由于农药残留的存在，极大地限制了药渣的资源化利用。从长期堆放的阿维菌素药渣中分离到一株对阿维菌素降解较好的菌株 AZ11，经 16S rDNA 序列分析鉴定为嗜热脂肪芽胞杆菌。研究结果表明，该菌在摇瓶振荡培养条件下 72h 对阿维菌素标准品的降解率可达 77.6%，大于 40℃的温度条件更适宜其生长，具有较好的蛋白酶和纤维素酶活性。该菌株可用于阿维菌素发酵废渣固体堆肥中，实现药渣的资源化、无害化利用（魏艳丽等，2013）。

（13）苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）

在生物农药生产过程中，粉碎能耗占据了生产成本的10%以上。采用纤维素酶对苏云金芽胞杆菌固体发酵培养基进行前处理，得到一种易粉碎的培养基，用该培养基发酵所得产品处理后能耗明显降低，且和原培养基发酵产品的效价相当，证明纤维素酶的加入没有影响菌种的生长（李智元和弓爱君，2010）。

二、碳源对芽胞杆菌产纤维素酶活性的影响

以酵母粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、CMC-Na、淀粉+CMC-Na 分别为碳源。考察芽胞杆菌 FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）纤维素酶、淀粉酶活性，由图 2-90 可知：芽胞杆菌 FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）以酵母粉为碳源时其淀粉酶活性最高，酶活性达 828.1U/ml，而其纤维素酶活性很低，纤维素酶活性仅为 13.4U/ml；以葡萄糖为碳源时，芽胞杆菌 FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）产纤维素酶活最高、淀粉酶活较低，其酶活分别为 76.1U/ml、22.5U/ml；麦芽糖、葡萄糖是淀粉酶作用于淀粉的底物，以这两种糖为碳源对产酶菌株的积累可能产生了产物抑制作用，而淀粉、CMC-Na 作为淀粉酶、纤维素酶的底物，高浓度的底物也会因底物抑制效应而阻遏产酶菌株的生长和产酶能力。

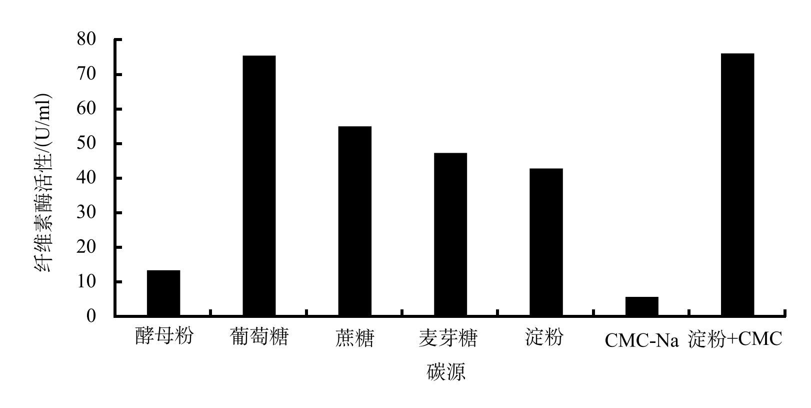


图 2-90　不同碳源对食苯芽胞杆菌菌株 FJAT-8758 纤维素酶活性的影响

以不同碳源对芽胞杆菌 FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）进行发酵产酶实验，分别对纤维素酶、淀粉酶活性进行测定，得出以酵母粉为碳源时 FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）产淀粉酶酶活最高，酶活为 828.1U/ml；以葡萄糖为碳源时 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）产纤维素酶酶活最高，酶活为 76.1U/ml；以淀粉+CMC-Na 为碳源时，纤维素酶、淀粉酶活均较高。从产复合酶菌株应用情况出发，可以选择合适的碳源进行发酵产酶。

三、初始 pH 对芽胞杆菌产纤维素酶活性的影响

1. 枯草芽胞杆菌 FJAT-201 纤维素酶活性测定

将枯草芽胞杆菌 FJAT-201 接种到不同 pH 的发酵培养基中，30℃、170r/min 条件下

培养 2d，对产酶情况进行对比，结果见表 2-57 和图 2-91。从结果可得出，FJAT-201（枯草芽胞杆菌）在 pH5～7 时酶活性较高，pH 为 6 时酶活性达最大，为 5.10U/ml，pH 大于 7 酶活开始下降。

表 2-57　枯草芽胞杆菌 FJAT-201 纤维素酶活性测定（OD_{540} 值）

项目	初始 pH								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
对照组	0.329	0.457	0.457	0.435	0.428	0.378	0.375	0.067	0.056
实验组	0.334	0.477	0.501	0.549	0.504	0.441	0.434	0.124	0.104
实际 OD_{540} 值	0.005	0.041	0.044	0.114	0.76	0.063	0.059	0.057	0.048
酶活/（U/ml）	0.22	1.83	1.97	5.10	3.40	2.82	2.64	2.55	2.15

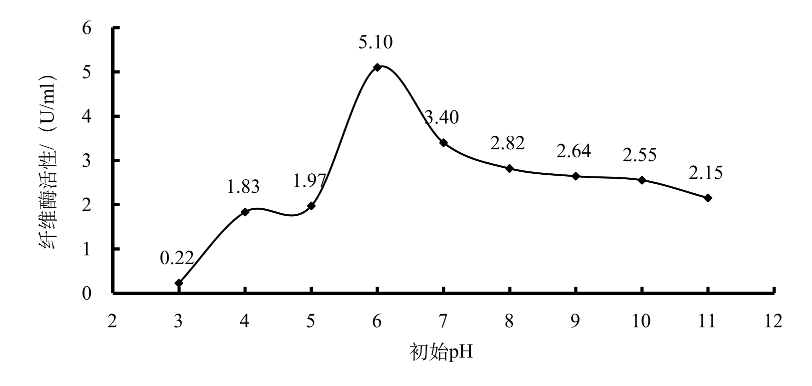


图 2-91　初始 pH 对枯草芽胞杆菌 FJAT-201 产纤维素酶活性的影响

2. 凝结芽胞杆菌 FJAT-520 纤维素酶活性测定

将凝结芽胞杆菌 FJAT-520 接种到不同 pH 的发酵培养基中，30℃、170r/min 条件下培养 2d，对产酶情况进行对比，结果见表 2-58 和图 2-92。从结果可得出，芽胞杆菌 FJAT-520（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）在 pH6～8 时酶活性较高，pH 为 7 左右时酶活性达最大，为 1.07 U/ml，并随着 pH 增大纤维素酶活力缓慢下降。

表 2-58　凝结芽胞杆菌 FJAT-520 纤维素酶活性测定（OD_{540} 值）

项目	初始 pH							
	4	5	6	7	8	9	10	11
对照组	0.279	0.217	0.211	0.201	0.173	0.162	0.136	0.116
实验组	0.292	0.237	0.232	0.225	0.192	0.178	0.149	0.124
实际 OD_{540} 值	0.013	0.020	0.021	0.024	0.019	0.017	0.013	0.008
酶活/（U/ml）	0.58	0.89	0.94	1.07	0.85	0.76	0.58	0.36

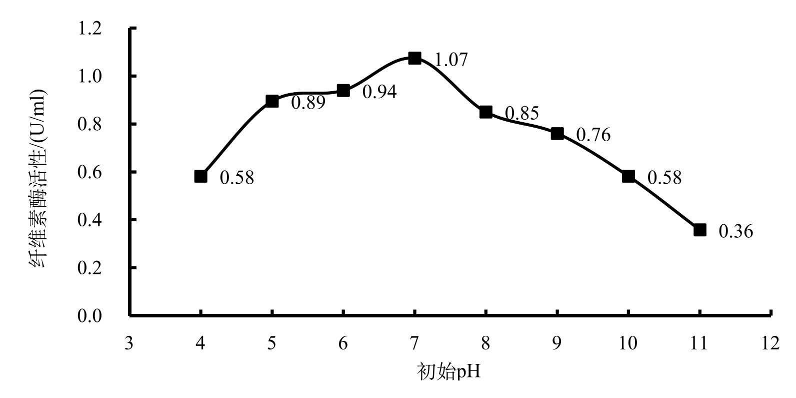


图 2-92 初始 pH 对凝结芽胞杆菌 FJAT-520 产纤维素酶活性的影响

四、芽胞杆菌产纤维素酶培养条件的优化

1. 芽胞杆菌产酶生长动力学

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 为例，据图 2-93 所知，解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 在 50L 发酵罐培养过程中菌体的生长是典型的“酵罐型曲线”，采用 Logistic 方程（阻滞方程）能较好地描述菌体的生长规律，能较好地反映分批发酵过程中因菌体浓度的增加对自身生长产生的抑制作用，并且能较好地拟合分批发酵过程菌体的生长规律。Logistic 方程公式（2-11）为

$$\frac{\mathrm{d}X}{\mathrm{d}t}=\mu_{\max}\left(1-\frac{X}{X_{\max}}\right)X \tag{2-11}$$

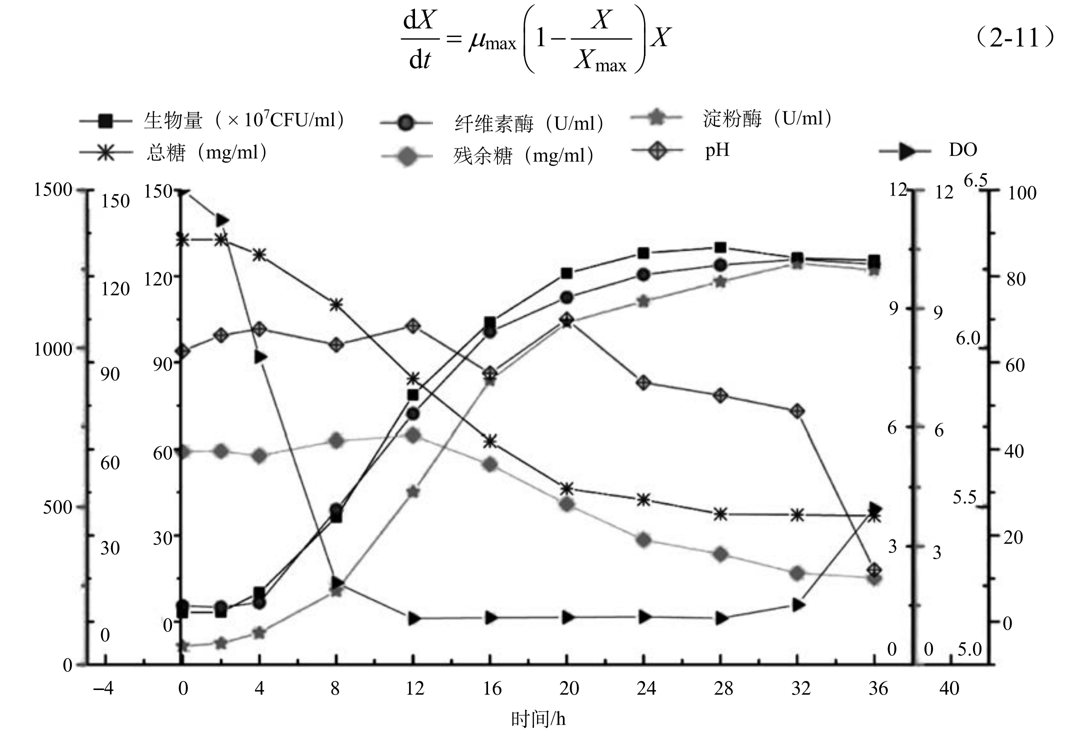


图 2-93 50L 发酵罐培养解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 发酵过程特征

积分得：

$$X = \frac{X_0 X_{\max} e^{t\mu_{\max}}}{X_{\max} - X_0 + X_0 e^{t\mu_{\max}}} \qquad (2\text{-}12)$$

式中，$\mu_{\max}$为最大比生长速率（h^{-1}）；X为菌体浓度（$\times 10^7$CFU/ml）；X_0为初始菌体浓度（$\times 10^7$CFU/ml）；$X_{\max}$为最大菌体浓度（$\times 10^7$CFU/ml）；t为时间（h）。

利用 Origin 9.0 软件通过编写自定义函数对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 生长进行非线性拟合，拟合模型曲线 R^2=0.997 66，模型预测值与实测值能较好地拟合，拟合结果见公式（2-13）、表 2-59、表 2-60、图 2-94。

$$X(t) = \frac{127.297 e^{0.33505t}}{37.653 + e^{0.33505t}} \qquad (2\text{-}13)$$

表 2-59　菌株 FJAT-8754 生长动力学方差分析结果

项目		自由度	平方和	均方差	F 值	F 检验
生物量	回归系数	3	98 021.3344	32 673.7781	4 686.2678	5.2902×10^{-13}
	残差	8	55.777 9	6.9722		
	未校正总和	11	98 077.1123			
	校正总和	15	38 152.0300			

表 2-60　菌株 FJAT-8754 生长动力学建模统计量检验结果

X_0		X_m		μ_m		统计检验	
值	标准误	值	标准误	值	标准误	残差卡平方	校正相关系数
3.2934	0.6299	127.2973	1.2999	0.3351	0.0182	6.9722	0.9976

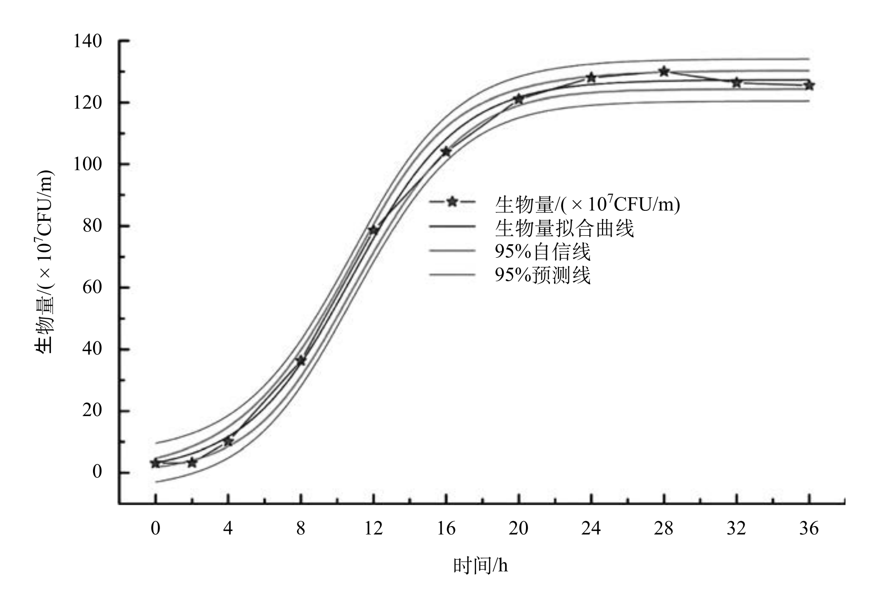


图 2-94　FJAT-8754 生长动力学模型拟合曲线

2. 芽胞杆菌产纤维素酶培养条件优化

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 为例，采用 U_7（7^3）均匀设计实验对发酵条件中的初始 pH、发酵温度、转速进行优化，优化结果见表 2-61。

表 2-61 U_7（7^3）均匀设计方案及结果

实验号	因素			纤维素酶活（Y_1）/（U/ml）
	X_1	X_2	X_3	
N1-1	4（6.0）	1（26）	5（190）	106.93
N1-2	4（6.0）	1（26）	5（190）	109.78
N1-3	4（6.0）	1（26）	5（190）	110.55
N2-1	6（7.0）	3（32）	1（210）	140.48
N2-2	6（7.0）	3（32）	1（210）	135.57
N2-3	6（7.0）	3（32）	1（210）	142.49
N3-1	1（4.5）	5（38）	4（180）	98.87
N3-2	1（4.5）	5（38）	4（180）	89.49
N3-3	1（4.5）	5（38）	4（180）	96.12
N4-1	3（5.5）	7（44）	6（200）	162.86
N4-2	3（5.5）	7（44）	6（200）	154.21
N4-3	3（5.5）	7（44）	6（200）	157.00
N5-1	2（5.0）	2（29）	2（160）	66.49
N5-2	2（5.0）	2（29）	2（160）	67.80
N5-3	2（5.0）	2（29）	2（160）	69.56
N6-1	7（7.5）	6（41）	3（170）	122.38
N6-2	7（7.5）	6（41）	3（170）	124.54
N6-3	7（7.5）	6（41）	3（170）	124.91
N7-1	5（6.5）	4（35）	1（150）	156.89
N7-2	5（6.5）	4（35）	1（150）	164.43
N7-3	5（6.5）	4（35）	1（150）	159.75

注：X_1 为培养基初始 pH；X_2 为培养温度/℃；X_3 为转速（r/min）

对表 2-61 的实验结果进行多因子及平方项逐步回归分析，对 Y_1 的回归方程为

$$\begin{aligned}Y_1 = &-4\,784.601\,43 + 609.800\,040\,1X_1 + 70.916\,667\,40X_2 + 19.625\,895\,811X_3 \\ &- 49.385\,659\,33X_1^2 - 0.948\,910\,765\,0X_2^2 - 0.053\,144\,597\,06X_3^2\end{aligned} \quad (2\text{-}14)$$

从方程的相关系数、F 值、剩余标准差及显著性水平可以看出，公式（2-14）均能较好地拟合出发酵条件对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 产纤维素酶的影响，所建模型准确有效。回归方程各项指标通过检验，利用 DPS V7.05 软件求解最大值得出产纤维素酶最优发酵条件为：初始 pH6.17、培养温度 37.4℃、转速 184.6r/min，Y_1 最优预测值为

234.7173U/ml；根据公式（2-14）预测的发酵条件微作改动，采用初始 pH6.2、培养温度 37.5℃、转速 180r/min 的发酵条件进行重新发酵，所得纤维素酶活为 202.9U/ml。

均匀设计法是我国数学家王元和方开泰于 1978 年提出的，该方法能以较少的均匀分布试验点获得最多的信息。该方法广泛用于寻找最优化工艺条件和最好的配方。柯崇榕等（2008）采用均匀设计法对黑曲霉 EIM-4 的发酵条件进行优化，在最优条件下黑曲霉 EIM 产果胶酶酶活提高了 36%。本研究利用均匀设计法对影响发酵过程的 3 个重要因素进行优化，优化后发酵产纤维素酶最优条件极为相似，故折中两种酶的优化条件进行验证，采用初始 pH6.2、培养温度 37.5℃、转速 180r/min 的发酵条件进行重新发酵，所得纤维素酶活为 202.9U/ml，实验测定值比理论值低了 13.58%，但比未优化前提高了 49.5%。

3. 芽胞杆菌产纤维素酶发酵罐培养特征

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 为例，以经摇瓶实验优化后的培养基作为发酵培养基，进行解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 产纤维素酶实验。发酵罐实验装液量 60%，接种 2%（*V*/*V*），搅拌转速 180r/min，培养温度 35℃（±0.5℃），通气量 0.3VVM，每 4h 在线读取 DO 值、pH 并取样考察发酵液中活菌浓度、纤维素酶活性、淀粉酶活性、总糖浓度、还原糖浓度。发酵过程中各参数动态变化见图 2-94。

对菌体的生长：解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 接种后很快进入对数生长期，并在 24h 时进入稳定期，此时菌体浓度达 1.2×10^9CFU/ml，同时纤维素酶随之在 32h 达最大酶活，酶活为 125.8U/ml；发酵过程中 DO 在接种后急剧下降，在 12h 时达溶氧低谷，且持续至 32h 后开始缓慢上升；pH 在整个发酵过程中变化并不明显，在 0～20h pH 保持稳定，20h 后开始慢慢下降，而在 32h 时由 5.8 急剧下降至 5.3；总糖在 0～4h 几乎没变化，而随菌体进入对数生长期后开始下降，在 20h 后总糖浓度不再下降，保持稳定；还原糖在 0～4h 浓度变化不大，4h 后由 5.3mg/ml 缓慢上升，并在 5.8mg/ml 后开始急剧下降，在 32h 后维持不变。从发酵罐各参数变化特征可确定解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 产纤维素酶的发酵终止时间。

比较 50L 发酵罐与摇瓶实验，摇瓶实验与发酵罐实验中纤维素酶的最大酶活均出现在菌体刚进入稳定期时期，但摇瓶实验中纤维素酶酶活均比发酵罐实验酶活高，50L 发酵罐发酵过程中，菌株生长的延滞期、对数生长期缩短。从图 2-93 中 DO 值、总糖与还原糖的变化可以看出，在发酵罐发酵过程中溶氧不足，导致菌体浓度低、纤维素酶产量低。

解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 发酵罐扩大培养与动力学建模。通过 50L 发酵罐扩大培养，初步探索解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 产纤维素酶复合酶发酵特征。利用 Origin 9.0 数据分析软件对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 产纤维素酶复合酶发酵过程进行分析处理，以 Logistic 方程（滞方程）拟合出解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 发酵过程中菌体生长动力学模型，以 Luedeking-Piert 公式对纤维素酶发酵过程中产物合成动力学，拟合结果中菌体生长动力学模型、产物合成动力学模型以及基质消耗动力学模型拟合方程的相关系数分别为：R^2=0.99 766（生长动力学）、R^2=0.996 57（纤维素酶合成动力学）、R^2=0.989 05（基质消耗动力学），由此可说明公式构成的解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 复合酶发酵动力学可较准确描述发酵过程中解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 菌体生长、纤维素酶合成、基

质消耗的变化规律。从拟合模型可准确地判断解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶的合成属于生长部分相关型。

五、芽胞杆菌纤维素酶产物合成动力学

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 为例，微生物发酵过程中代谢生产的除菌体以外的物质成为产物。微生物发酵产物按微生物生长速率与产物合成速率的关系可分为 3 类：①生长相关型，也称为生长耦联型，即代谢产物的生成与细胞的生长密切相关，产物的生成是微生物细胞主要能量代谢的直接结果，其产物通常是基质分解代谢产物或合成细胞生长必需的代谢产物；②生长部分相关型，即部分耦联型，产物是能量代谢的间接结果，不是底物的直接转化，其生成与底物的消耗仅有时间关系，与微生物生长部分耦联；③非生长相关型，即非耦联型，此类产物的合成与能量代谢无关，与细胞生长无直接关系，而与细胞的积累有关。产物的合成出现在微生物稳定期，大多为次级代谢产物。解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶为胞外蛋白酶，由图 2-95 所示，纤维素酶随菌体的增长而增加，达稳定期后才达较高酶活。本实验以纤维素酶为产物动力学模型的研究对象，由图 2-95 纤维素酶活的变化与底物的消耗间接相关，初步确定产物的生成为部分耦联型。因此选择同时存在非生长相关型和生长相关型的 Luedeking-Piert 公式（2-15）来描述纤维素酶的合成动力学：

$$\frac{\mathrm{d}P}{\mathrm{d}x}=\alpha\frac{\mathrm{d}X}{\mathrm{d}t}+\beta X=\alpha\mu X \tag{2-15}$$

式中，α 为与生长相关联的产物合成系数；β 为与生长无关的产物合成比速率；

对（2-15）公式两边同时除以 X 即得产物比合成速率公式（2-16）：

$$Q_p=\alpha\mu+\beta \tag{2-16}$$

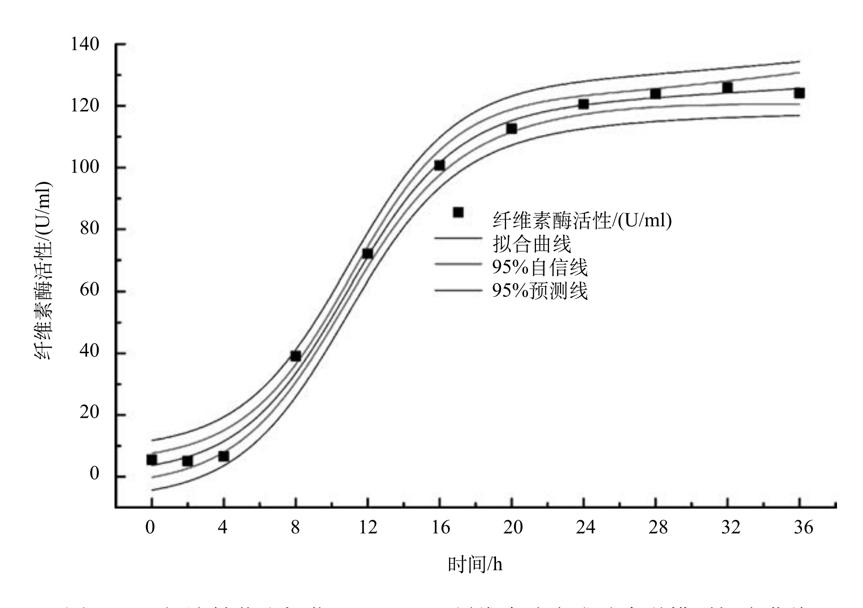


图 2-95　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶合成动力学模型拟合曲线

式中，μ 为菌体的比生长速率；α、β 为常数。

将（2-15）代入（2-16）并对公式积分，整理得到公式（2-17）：

$$P(t)=P_0-\alpha X_0+\alpha\frac{X_0X_m e^{\mu_m t}}{X_m-X_0+X_0e^{\mu_m t}}+\frac{X_m\beta}{\mu_m}\ln\left(\frac{X_m-X_0+X_0e^{\mu_m t}}{X_m}\right) \quad (2\text{-}17)$$

将已知 X_0、X_m、μ_m 拟合值代入公式（2-17），应用 Origin 9.0 软件进行非线性自定义函数拟合，使用 Levenberg-Marguardt 参数拟合工具箱，以 Pearson Chi-square 检验（相关系数卡方检验），对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 分批发酵产纤维素酶分别进行拟合求参数 α、β，将参数代入公式（2-17）即得解淀粉芽胞杆菌 FJAT-纤维素酶合成动力学模型，拟合结果见表 2-62 和表 2-63。

解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶合成动力学模型：

$$P_t=-0.694+\frac{116.576e^{0.33505t}}{37.652+e^{0.33505t}}+0.55\ln（0.9741+0.0259e^{0.33505t}） \quad (2\text{-}18)$$

表 2-62　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶合成动力学拟合曲线方差分析

项目	自由度	平方和	均方差	F 值	F 检验
回归系数	3	90 643.5500	30 214.5200	3 233.5970	2.3300×10^{-12}
残差	8	74.7514	9.3439		
未校正总和	11	90 718.3100			
校正总和	10	27 218.9800			

表 2-63　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 纤维素酶合成动力学建模参数估计

α_1		β_1		P_1		统计检验	
值	标准误	值	标准误	值	标准误	残差卡平方	校正相关系数
0.9157	0.0324	0.0026	0.0015	3.7101	1.6867	9.3439	0.9965

注：α_1 为与生长相关联的纤维素酶合成系数；β_1 为与生长无关的产物合成比速率

六、芽胞杆菌纤维素酶底物消耗动力学

以解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 为例，在发酵过程中，玉米淀粉作为培养基中唯一的碳源，主要用于菌体的生长及维持菌体基本生命活动和代谢产物的生成。为方便建模的简化，可将解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 产复合酶发酵过程中玉米淀粉的消耗分为两个部分：菌体生长消耗基质、产物合成消耗基质，将维持生命活动的基质消耗纳入菌体生长消耗基质中。因此限制性底物的消耗模型可用式（2-19）表示：

$$\frac{dS}{dt}=-\frac{dX}{dt}\times\frac{1}{Y_{X/S}}-\frac{dP}{dt}\times\frac{1}{Y_{P/S}} \quad (2\text{-}19)$$

式中，$Y_{X/S}$ 表示细胞对碳源的得率常数；$Y_{P/S}$ 为酶活对碳源的得率常数。

将式（2-14）、式（2-15）代入式（2-19），并对公式进行积分处理得

$$St = S_0 + \frac{X_0}{Y_{X/S}} - \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{Y_{S/X}(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t})} + X_0 \times \frac{\alpha}{Y_{P/S}} - \frac{\alpha}{Y_{P/S}} \times \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - \frac{\beta}{Y_{P/S}} \times \frac{X_m}{\mu_m} \times \ln \frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_0 X_m e^{\mu_m t}} \tag{2-20}$$

将纤维素酶合成动力学公式代入整理得

$$St = S_0 + \frac{X_0}{Y_{X/S}} + X_0\left(\frac{\alpha_1}{Y_1} + \frac{\alpha_2}{Y_2}\right) - \frac{1}{Y_{X/S}} \times \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - \left(\frac{\alpha_1}{Y_1} + \frac{\alpha_2}{Y_2}\right) \times \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - \frac{X_m}{\mu_m} \times \left(\frac{\beta_1}{Y_1} + \frac{\beta_2}{Y_2}\right) \times \ln\left(\frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_0 X_m e^{\mu_m t}}\right) \tag{2-21}$$

式中，α_1 为与生长相关联的纤维素酶合成系数；β_1 为与生长无关的产物合成比速率；Y_1 为纤维素酶活产物与基质的得率常数；α_2 为与生长相关联的纤维素酶合成系数；β_2 为与生长无关的产物合成比速率；Y_2 为纤维素酶活产物与基质的得率常数；S_0 为培养初期的初始基质浓度（μg/ml）。

利用 Origin 9.0 软件进行非线性拟合，采用 Levenberg-Marguardt 参数拟合工具箱，以 Pearson Chi-square 检验（误差平方和最小），对解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 分批发酵基质消耗进行拟合求参数 Y_1、Y_2，拟合结果见表 2-64、表 2-65、图 2-96、公式（2-22）：

$$S(t) = 10899.8691 - \frac{7091.6724 e^{0.33505t}}{37.653 + e^{0.33505t}} - 0.5011 \ln (0.9741 + 0.0259 e^{0.33505t}) \tag{2-22}$$

表 2-64　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-86754 基质消耗动力学拟合曲线方差分析结果

项目	自由度	平方和	均方差	F 值	F 检验
回归系数	4	5.85×10^8	1.46×10^8	1485.6704	3.55×10^{-10}
残差	7	6.89×10^5	9.84×10^4		
未校正总和	11	5.85×10^8			
校正总和	10	8.99×10^7			

表 2-65　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-8754 底物消耗动力学建模参数估计

S_0		Y_0		Y_1		Y_2		统计检验	
值	标准误	值	标准误	值	标准误	值	标准误	残差卡平方	校正相关系数
10 899.8691	495.0649	0.0181	—	3.1448	—	42.3143	—	98 447.876 8	0.9891

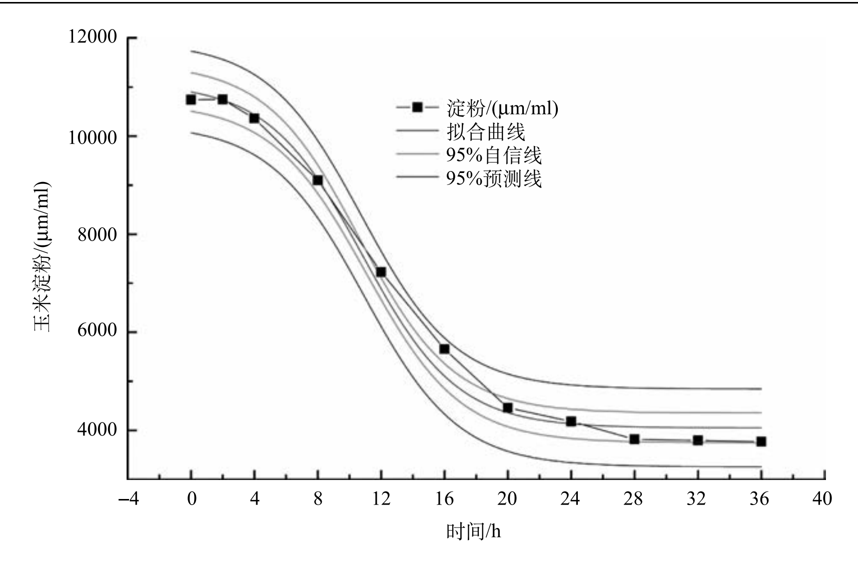


图 2-96　玉米淀粉底物消耗动力学模型拟合曲线

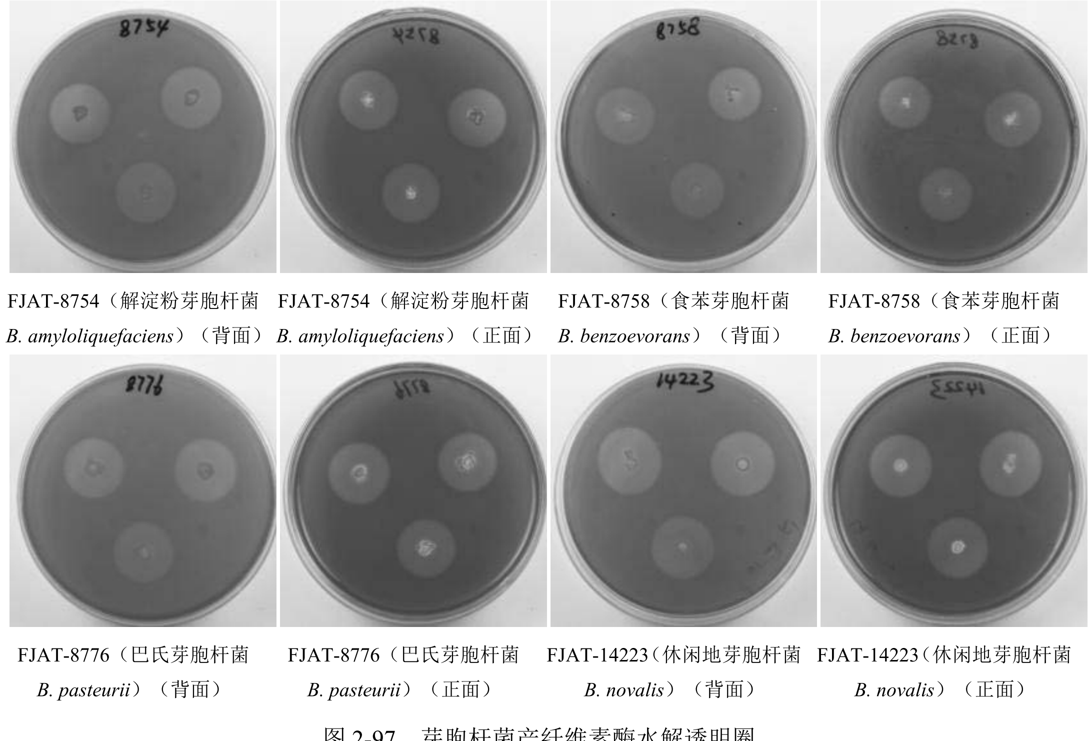
分批发酵过程中生物量、纤维素酶活、玉米淀粉浓度的实测值与预测值见表 2-66。结果表明，实测值与预测值比较吻合。

表 2-66　分批发酵过程中生物量、纤维素酶活、玉米淀粉浓度的实测值与预测值

时间	菌体浓度/（$\times 10^7$CFU/ml）		纤维素酶/（U/ml）		残糖浓度/（μg/ml）	
/h	实测值	预测值	实测值	预测值	实测值	预测值
0	3.1	3.3	5.5	3.7	10 741.5	10 741.5
2	3.3	6.3	5.1	6.5	10 746.8	10 746.8
4	10.1	11.7	6.6	11.5	10 360.0	10 360.0
8	36.3	35.6	39.0	33.6	9 098.3	9 098.3
12	78.7	76.0	72.1	71.1	7 226.9	7 226.9
16	104.0	108.2	100.7	101.6	5 655.1	5 655.1
20	121.0	121.7	112.6	115.2	4 461.0	4 461.0
24	128.0	125.8	120.5	120.2	4 179.9	4 179.9
28	130.0	126.9	123.9	122.6	3 817.2	3 817.2
32	126.3	127.2	125.8	124.2	3 793.9	3 793.9
36	125.5	127.3	124.1	125.6	3 769.0	3 769.0

七、芽胞杆菌产纤维素酶水解透明圈的测定

使用了120种芽胞杆菌进行纤维素酶活性检测，只有28种芽胞杆菌能产生纤维素酶，其菌落水解透明圈照片见图 2-97。



FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）（背面）　FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）（正面）　FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）（背面）　FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）（正面）

FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）（背面）　FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）（正面）　FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）（背面）　FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）（正面）

图 2-97　芽胞杆菌产纤维素酶水解透明圈

八、芽胞杆菌纤维素酶活性分析

120 种芽胞杆菌均选自福建省农业科学院农业生物资源所菌种库，筛选出有纤维素酶活性的菌株 28 株，其水解透明圈 *H*/*C* 值和纤维素酶活性见表 2-67。从表中可知，①不同种类的芽胞杆菌产纤维素酶的能力差异很大；②芽胞杆菌纤维素酶酶水解透明圈 *H*/*C* 值为 1.78～11.31，种类间纤维素酶 *H*/*C* 值相差 6.35 倍；③芽胞杆菌纤维素酶活性为 0.17～21.15U/ml，种类间纤维素酶生产能力相差 124.41 倍；④芽胞杆菌种类间的纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值与纤维素酶活性之间无线性关系。

表 2-67　芽胞杆菌产纤维素酶活性测定

	菌株编号	*H*/*C* 值	酶活/（U/ml）
1	FJAT-14216（尼氏芽胞杆菌 *B. nealsonii*）	2.04	0.17
2	FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）	1.80	0.21
3	FJAT-14260（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）	1.85	0.55
4	FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）	2.36	0.84
5	FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonorensis*）	2.86	1.06
6	FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）	2.48	1.14
7	FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）	2.30	1.74
8	FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）	4.27	1.94

续表

菌株编号	H/C 值	酶活/（U/ml）
9　FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 B.*subtilis* subsp. *inaquosorum*）	4.80	2.65
10　FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）	4.23	3.00
11　FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）	3.16	3.39
12　FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）	3.52	3.77
13　FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）	3.59	4.07
14　FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）	3.57	4.10
15　FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）	3.29	4.14
16　FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）	4.19	4.76
17　FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）	4.00	4.91
18　FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）	3.88	5.35
19　FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）	3.76	5.43
20　FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）	3.36	6.23
21　FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B.subtilis*）	6.04	7.21
22　FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B.benzoevorans*）	4.98	8.53
23　FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）	4.31	8.73
24　FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）	6.13	10.15
25　FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*）	1.78	12.58
26　FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）	11.31	15.69
27　FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）	3.57	17.58
28　FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）	4.92	21.15

九、芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-67 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-98，可以将 28 种芽胞杆菌产纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为 3 类。

第 1 类：纤维素酶水解透明圈大小中等，*H*/*C* 值为 1.78～4.98，其包含了 25 种芽胞杆菌，即 FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-14260（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-14216（尼氏芽胞杆菌 *B. nealsonii*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonorensis*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14247（花津滩

芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B.benzoevorans*）。

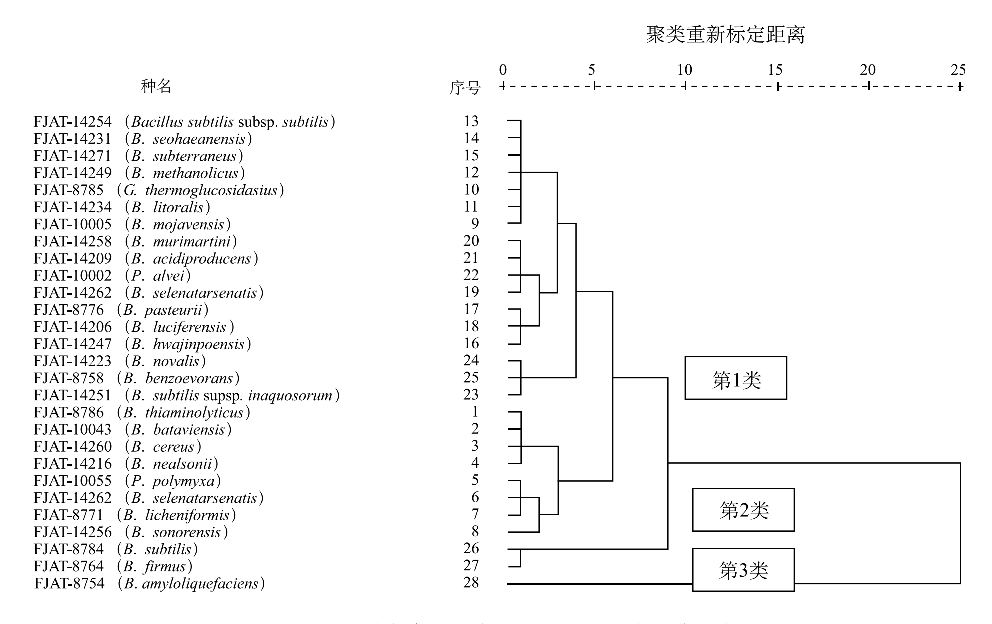


图 2-98　纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

第 2 类：纤维素酶水解透明圈中等，*H*/*C* 值为 6.04～6.13，其包括了两种个芽胞杆菌，即 FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B.subtilis*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）。

第 3 类：纤维素酶水解透明圈较大，*H*/*C* 值为 11.31，其包含了一种芽胞杆菌，即 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）。

十、芽胞杆菌纤维素酶活性聚类分析

利用表 2-67 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 28 种芽胞杆菌的纤维素酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-99。芽胞杆菌纤维素酶活性可以分为 3 类。

第 1 类：该类芽胞杆菌纤维素酶活性较低，为 0.17～5.43U/ml，其包含了 19 种芽胞杆菌，即 FJAT-14216（尼氏芽胞杆菌 *B. nealsonii*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-14260（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonorensis*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-10005（莫哈

维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-8776（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）。

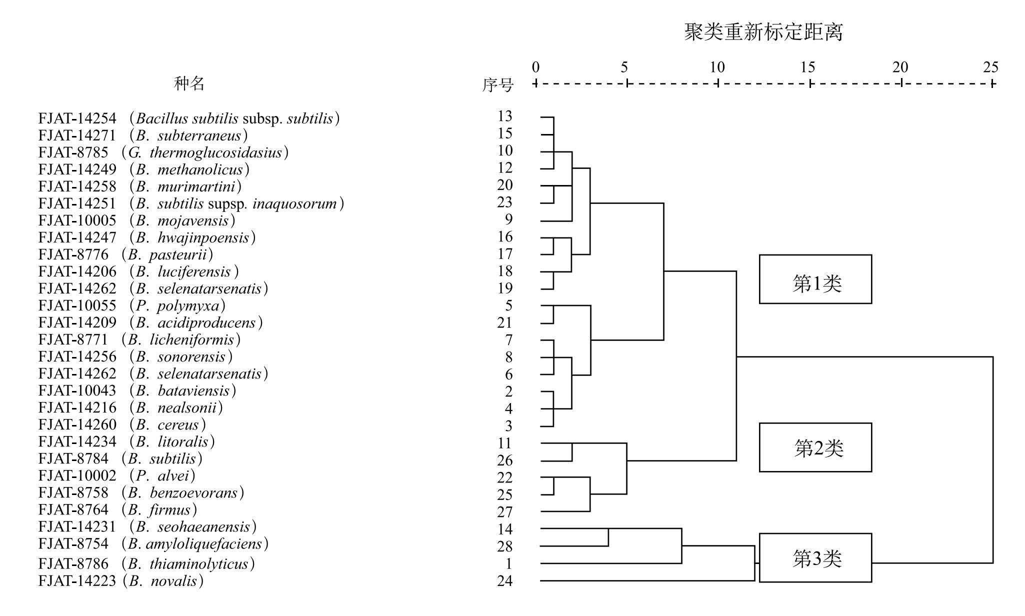


图 2-99　芽胞杆菌纤维素酶活性聚类分析

第 2 类：芽胞杆菌纤维素酶活性中等，为 6.23～10.15U/ml，其包含了 5 种芽胞杆菌，即 FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）、FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B.subtilis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B.benzoevorans*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）。

第 3 类：芽胞杆菌纤维素酶活性较高，为 12.58～21.15U/ml，其包含了 4 种芽胞杆菌，即 FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*）、FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）。

十一、芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择既测定过纤维素酶水解透明圈，又测定过纤维素酶活性的 28 种芽胞杆菌进行分析。芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在着 4 种类型：①芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值大而纤维素酶活性低，如 FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*），*H*/*C* 值为 4.27，纤维素酶活性为 1.94U/ml；②芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而纤维素酶活性高，如 FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*），*H*/*C* 值为 1.78 ，纤维素酶活性为 12.58U/ml；③芽胞杆菌纤维素酶水

解透明圈 *H*/*C* 值大同时纤维素酶活性高，如 FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*），*H*/*C* 值为 4.92，纤维素酶活性为 21.15U/ml；④芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值小同时纤维素酶活性低，如 FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*），*H*/*C* 值为 1.80，纤维素酶活性为 0.21U/ml。芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值和纤维素酶活性经常是不同步的，这与其生物学特性有关，作者检测的时期，也许是芽胞杆菌纤维素酶检测的最好时期，但对于纤维素酶水解透明圈的测定不是最佳时期，同样，培养条件、营养条件、菌株种类等都有影响。

以欧氏距离为尺度，用类平均法进行聚类分析，聚类图见图 2-100。基于纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值与纤维素酶活性的芽胞杆菌分为 3 类。

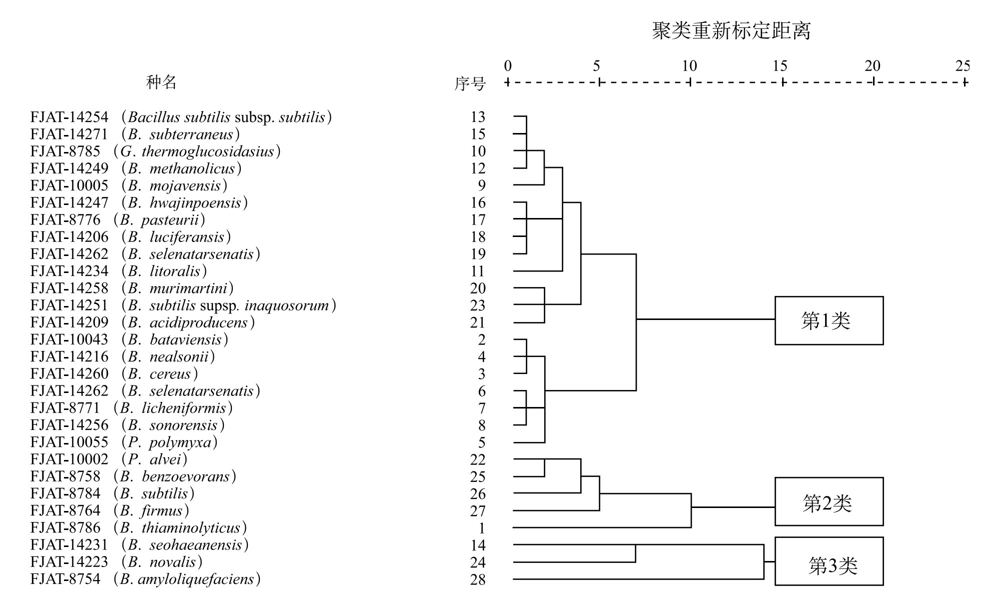


图 2-100　芽胞杆菌纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值与纤维素酶活性的相互关系聚类分析

第 1 类：20 种芽胞杆菌聚为一类，该类芽胞杆菌纤维素酶活性较低，为 0.17～6.23U/ml，纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值变化较大，为 1.80～4.80，包括 FJAT-14216（尼氏芽胞杆菌 *B. nealsonii*）、FJAT-10043（巴达维亚芽胞杆菌 *B. bataviensis*）、FJAT-14260（蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonorensis*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-10055（多粘类芽胞杆菌 *P. polymyxa*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-14251（枯草芽胞杆菌因氏亚种 *B.subtilis* subsp. *inaquosorum*）、FJAT-14258（马丁教堂芽胞杆菌 *B. murimartini*）、FJAT-10005（莫哈维芽胞杆菌 *B. mojavensis*）、FJAT-14249（甲醇芽胞杆菌 *B. methanolicus*）、FJAT-14271（地下芽胞杆菌 *B. subterraneus*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-8785（热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 *G. thermoglucosidasius*）、FJAT-14262（硒砷芽胞杆菌 *B. selenatarsenatis*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-8776

（巴氏芽胞杆菌 *B. pasteurii*）、FJAT-14247（花津滩芽胞杆菌 *B. hwajinpoensis*）、FJAT-14234（岸滨芽胞杆菌 *B. litoralis*）。

第 2 类：5 种芽胞杆菌聚为一类，其特点是纤维素酶活性较高，为 7.21～12.58U/ml，纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值差异较大，为 1.78～6.04，包括 FJAT-8784（枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*）、FJAT-8758（食苯芽胞杆菌 *B. benzoevorans*）、FJAT-10002（蜂房类芽胞杆菌 *P. alvei*）、FJAT-8764（坚强芽胞杆菌 *B. firmus*）、FJAT-8786（解硫胺素类芽胞杆菌 *P. thiaminolyticus*）。

第 3 类：3 种芽胞杆菌聚为一类，其特点是纤维素酶活性较高，为 15.69～21.15U/ml，纤维素酶水解透明圈 *H*/*C* 值差异较大，为 3.57～11.31，包括 FJAT-8754（解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*）、FJAT-14231（西岸芽胞杆菌 *B. seohaeanensis*）、FJAT-14223（休闲地芽胞杆菌 *B. novalis*）。

第十二节　芽胞杆菌植酸酶特性

一、概述

（1）有关植酸酶的研究

目前较多的是微生物产生的植酸酶，对其进行的分离纯化及理化性质研究表明，它们可能是饲用植酸酶的最佳来源。其中以对真菌的酸性植酸酶研究最多，目前已构建各种基因工程菌并得到高效表达，同时进行了大规模的发酵生产，大大提高了酶产量和降低了生产成本。由于酸性植酸酶其酶促反应的有效作用 pH 为 2.5～5.5，因此主要应用于胃 pH 呈酸性的单胃动物及少数鱼类如虹鳟等，而不适合用于消化道呈中性的鲤科鱼类，以及 pH 呈中性的单胃动物，限制了酸性植酸酶的应用范围。研究表明，来源于芽胞杆菌的植酸酶属于中性植酸酶（3-Phytase，EC 3.1.3.8），不仅具有较好的热稳定性，有助于抵抗饲料制粒或者膨化过程中高温引起的酶失活，而且其酶促反应的有效作用 pH 为 7.0～7.5，可以有效弥补酸性植酸酶的不足。此外，有的芽胞杆菌所具有的胞外植酸酶活性，对在磷酸限制条件下的植物具有促生长作用。

（2）产植酸酶芽胞杆菌的分离

芽胞杆菌可以孢子的形式存活，适应外环境能力强，广泛存在于自然界中，以土壤中分布最多。由于芽胞杆菌可在 45～55℃温度下生长，其孢子也具有较强的耐热性，因此在初次分离芽胞杆菌时，一般都对样品采用热处理的方法，将其他大部分杂菌杀灭。具体方法是，将生理盐水或蒸馏水浸泡的样品 80℃水浴处理 10～15min，或沸水浴中处理 5min。然后取热处理后的浸液 0.1ml 与 50℃左右的营养琼脂培养基在平板混合，28～30℃需氧培养 24～48h。将营养平板上的单菌落点种到含有植酸钙（钠）的植酸酶筛选培养基上，28℃培养 3～5d，观察是否产生透明消解圈。由于有些细菌可能产生大量的酸性代谢产物，也可使筛选培养基出现透明的消解圈，引起假阳性的出现，因此必须将产生透明消解圈的菌株经产酶培养基培养后，取培养液在中性条件下进行植酸酶活性的测定，并进一步镜检和生化鉴定。目前已分离出多种产植酸酶的芽胞杆菌，主要是枯草

芽胞杆菌（*B. subtilis*），其他有地衣芽胞杆菌（*B. lichenofonnis*）、解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）及其变种等。

（3）植酸酶差异

由于产植酸酶芽胞杆菌分离来源的不同，所属种也不尽相同，因此其植酸酶的产酶特性有所差异。Powar 和 Jagannathan（1982）从土壤中分离的 *B. subtilis* 2712 菌株的产酶诱导试验表明：在以葡萄糖+酪蛋白、淀粉+酪蛋白为碳源的培养基中没有植酸酶产生，即使添加肌醇也不能诱导其产生。而植酸盐、酵母浸膏或麦茨浸液（均含有植酸盐）可诱导植酸酶的产生，将以上 3 种诱导物中的任何一种添加到以麦芽糖和淀粉为碳源的培养基中可产生植酸酶。在以酪蛋白水解物为主要氮源的培养基中，24h 内就可检测到植酸酶显著产生，并于 72h 达酶活高峰。Shimizu（1992）从日本传统水豆豉中分离的 *B. subtilis* N-77 菌株，在含有 10nmol $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、1%葡萄糖、1%D-甘露糖和 0.5%酵母浸膏的心脏浸剂（HI）肉汤中 37℃需氧培养 5d 后达植酸酶最高酶活，表明 Ca^{2+}和 D-甘露糖能很强地刺激植酸酶产生，其最适浓度分别为 5mmol 和 1%。Kim 等（1998）从牛场附近的土壤中分离的 *Bacillus* sp. DSll 菌株，在含有麦麸和酪蛋白水解物的产酶培养基中培养 24h 达植酸酶酶活高峰。Kerovuo 等（1998）从菌种库中筛选的 *B. subtilis* VTT E-68013 菌株，在麦麸培养基中培养 50h 达植酸酶最高酶活，该菌株的产酶诱导试验表明，植酸盐并不能诱导植酸酶产生，而是抑制细菌蛋白的表达。虽然含有无机磷酸盐的 M9 基础培养基与植酸盐一样不能诱导植酸酶产生，但在以植酸盐为唯一磷酸盐来源的培养基（如植酸酶筛选培养基）中可诱导植酸酶的分泌，而且比 LB 肉汤含有更少的无机磷酸盐的马铃薯-葡聚糖培养基也可诱导植酸酶的产生。这些研究表明，植酸酶的产生受无机磷酸盐的抑制，磷酸饥饿可诱导植酸酶的产生。基于此，Janne 等（1998）运用了一种新的芽胞杆菌表达系统，该系统与磷酸盐运输相关的 pst 操纵子对磷酸饥饿反应具有强烈诱导作用。作为磷酸饥饿的结果，由 *pst* 启动子引发的表达可被诱导至 5000 倍以上，为芽胞杆菌植酸酶的高效表达提供了有效途径。

（4）芽胞杆菌植酸酶活性测定方法

目前文献报道的测定芽胞杆菌植酸酶酶活的方法主要有以下 4 种：①Vishnu 等（1982）报道，反应液中含有 200μmol Tris-HCl、1μmol $CaCl_2$、0.67μmol 植酸钠（相当于 4μmol 植酸磷）及酶液，共 2ml，pH7.5，30℃培育 10min 后加入 2ml 10%三氯乙酸终止反应，测定释放出的无机磷。一个植酸酶活性单位为：在此测定条件下，每分钟从植酸钠溶液中释放 1μmol 无机磷所需要的酶量。②Mikio（1992）、Janne 等（1998）以及王亚茹和范云六（2001）报道，150μl 酶液+600μl 2mmol/L 植酸钠、0.1mol/L Tris-HCl（pH7.0）、2mmol $CaCl_2$，37℃水浴 15～30min，加 750μl 5%三氯乙酸终止反应。加入 1.5ml 显色液（4∶1＝1.5%铅酸氨、5.5%硫酸∶2.7%硫酸亚铁），生成的磷铅酸盐在 700nm 下测定 OD 值。一个植酸酶活性单位为：在此测定条件下，每分钟从植酸钠溶液中释放 lμmol 无机磷所需要的酶量。③Young 等（1998）报道，100μmol 酶液+400μl 2mmol/L 植酸钠、0.1mol/L Tris-HCl（pH7.0）、2mmol $CaCl_2$，37℃水浴 30 min，加 500μl 15%三氯乙酸终止反应。加入 4ml 显色液（1∶1∶2∶6＝1/L 硫酸∶2.5%钼酸氨∶10%抗坏血酸∶水），37℃水浴 30min，生成的磷银酸盐在 820nm 下测定 OD 值。一个植酸酶活性

单位为：在此测定条件下，每分钟从植酸钠溶液中释放 1μmol 无机磷所需要的酶量。④吴琦等（2003）报道，0.5ml 酶液+l.5ml 0.1mol/L Tris-HCl（pH7.5）、2mmol $CaCl_2$，37℃预热 5min；加 4ml 2mmol/L 植酸钠、0.1mol/L Tris- HCl（pH7. 5）、2mmol $CaCl_2$，37℃水浴 30min；加 4ml 显色液（100g/L 钼酸氨 250ml＋2.35g/L 钒酸氨 250ml＋65 %纯硝酸 165ml，用水补充至 1000ml），生成的磷铅酸盐在 415nm 下测定 OD 值。一个植酸酶活性单位为：在此测定条件下，每分钟从植酸钠溶液中释放 1mmol 无机磷所需要的酶量。以上 4 种方法虽然都可以用于芽胞杆菌植酸酶酶活的测定，但由于使用试剂和显色反应的不同，对测定结果有一定的影响，进而影响不同方法测定的酶活性大小的可比性。因此，有必要对这 4 种测定植酸酶的方法进行对比试验，以确定测定的差异，并建立一种标准和通用的测定方法。

（5）芽胞杆菌植酸酶的纯化

已报道的有关芽胞杆菌植酸酶的具体纯化方法各不相同，基本上都考虑到以下 3 点：①芽胞杆菌植酸酶分泌能力较低，分离纯化必须对大量培养液进行高度浓缩；②纯化过程基本上都控制在 0～4℃进行；③芽胞杆菌植酸酶的酶活对钙离子具有特异的依赖性，因此使用的所有缓冲液中都应有一定浓度的 $CaCl_2$。据报道，具体纯化方法如下：①Powar 等（1982）报道，将预冷的乙醇沉淀培养液中的酶蛋白沉淀清洗后，在含有 P_2O_5 和固体石蜡的容器里 0℃真空干燥。获得的酶干粉经乙酸缓冲液浸提后，用预冷的丙酮再次沉淀。清洗沉淀，用乙酸缓冲液再次浸提后透析 24h，然后将酶溶液吸附在离子交换树脂（Amberlite IRP-64）上洗脱。活性洗脱液冻干浓缩后透析，重复一次。酶液过二乙胺乙基纤维素层析柱（DEAE-cellulose 柱），收集活性洗脱液，浓缩透析后即得纯酶。其总回收率为 32%，纯化倍数为 39。②Shimizu（1992）报道，由于植酸酶具有较高的热稳定性，以下步骤均在室温下进行。培养液通过 DiaflO YM3 膜超滤，浓缩 50 倍。浓缩后的滤液过 Sephadex G-100 柱，活性洗脱液超滤浓缩。将酶液再次过 Sephadex G-11 柱，活性洗脱液超滤浓缩。将酶液过 DEAE-Sopharose CL-6B 柱，活性洗脱液超滤浓缩。将酶液第 3 次过 Senhadex G-100 柱，活性洗脱液超滤浓缩，即得纯酶。其总回收率为 14.6%，纯化倍数为 322.2。③Kerovuo 等（1998）报道，将预冷的乙醇沉淀培养液中的酶蛋白沉淀清洗后，在氮气流中蒸发后冻干，再溶解。酶溶液经 65%和 85%饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$ 处理，沉淀后再溶解。酶溶液过 PD-10 胶过滤柱，洗脱后用单向高效液相色谱（HP-HPLC）柱纯化，并用含有浓度呈线性梯度的乙腈的三氟乙酸溶液洗脱，活性洗脱液冷冻干燥，再溶解。其总回收率为 22%，纯化倍数为 78.73。④Kim 等（1998）报道，将预冷的乙醇沉淀培养液中的酶蛋白沉淀经 Tris-HCl（pH7.0）浸提后，加入固体 $(NH_4)_2SO_4$ 至终浓度为 1.5mol/L。酶溶液过苯基琼脂糖凝胶（phenyl sephosc）柱层析，用线性下降梯度的 $(NH_4)_2SO_4$ 洗脱。活性洗脱液透析后，转入 Resouoe S 柱，用含 0～0.5mol/L 线性梯度的 NaCl 缓冲液洗脱。活性洗脱液透析后，将酶液通过 Superose 12 HR 10/30 柱做最后纯化，收集活性组分，用 bacon PM 10 膜超滤浓缩。其总回收率为 10%。⑤王亚茹和范云六（2001）报道，将预冷的乙醇沉淀培养液中的酶蛋白沉淀清洗后，酶溶液经 65%和 85%饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$ 处理后，沉淀再溶解。酶溶液首先经 HIPrep-26/10 脱盐柱脱盐，然后用离子交换柱 Hitrip-SP-Sepgmse-XL 分离，收集的活性洗脱液再用凝胶柱

Sllperdex-75-HR-10/30 纯化，收集活性洗脱液即为纯酶。其总回收率为 18%，纯化倍数为 1000。

（6）　芽胞杆菌植酸酶的酶学特性

1）芽胞杆菌植酸酶的一般酶学性质。各种芽胞杆菌植酸酶的酶学性质基本一致，具有相近的分子质量和等电点，都具有较高的热稳定性，最适 pH 均在 7 左右。它们对植酸钠的 K_m 值及底物特异性却存在一定差异，可能是因来源不同而在酶蛋白细微结构上存在差异所致。

2）芽胞杆菌植酸酶的热稳定性。芽胞杆菌植酸酶具有比真菌来源和大肠杆菌来源植酸酶更好的热稳定性。Kim 等（1998）报道的芽胞杆菌 *Bacillus* sp. DSll 植酸酶在 90℃处理 10min 后酶活可保留 50%。Kerovuo 等（1998）研究表明，枯草芽胞杆菌植酸酶在 Ca^{2+}溶液 60℃培育 10min 后保留酶活 90%以上，若没有 Ca^{2+} 存在则无酶活，在 Ca^{2+}溶液 100℃培育 10min 后保留酶活 20%。他们的研究表明，只有在 Ca^{2+}的存在下，植酸酶才有热稳定性，而且在热诱导的变性后植酸酶才可部分复性。可见无 Ca^{2+}的植酸酶热变性是不可逆的，Ca^{2+}对植酸酶的三维结构具有稳定作用。

3）芽胞杆菌植酸酶对钙离子的依赖性。芽胞杆菌植酸酶的酶学性质与真菌植酸酶有所不同，如乙二胺四乙酸（EDTA）等螯合剂很容易使芽胞杆菌植酸酶失活，而 EDTA 却是真菌植酸酶的激活剂。特别是芽胞杆菌植酸酶的活性有赖于金属离子的存在。去除了钙离子的芽胞杆菌植酸酶脱辅基酶与相同浓度的各种二价阳性离子（Ca^{2+}、Zn^{2+}、Ni^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Mg^{2+}、Cu^{2+}）的氯化物室温培育过夜，结果表明只有钙离子可以部分恢复植酸酶的活性，即恢复了植酸酶酶活的这种脱辅基酶与金属离子之间的相互作用具有离子特异性。钙离子对芽胞杆菌植酸酶至关重要。首先，酶活性可被诸如 EDTA 等螯合剂完全抑制（只要其物质的量浓度超过钙离子浓度），引起酶抑制最大可能的原因是从酶中移除了 Ca^{2+}。只要再加入 Ca^{2+}，酶蛋白可明显地重新表现活性，而再加入其他金属离子则不能或者只能部分替代 Ca^{2+}而形成有活性的酶。Ca^{2+}浓度超过植酸酶浓度时则引起酶的抑制。其次，植酸酶的全酶、脱辅基酶和钙重新激活酶的圆二色光谱（CD 光谱），揭示了 Ca^{2+}在蛋白构造中的局部作用。实验结果表明，培育在有 Ca^{2+}的环境中，失活酶蛋白的结构变化仅仅是使部分酶蛋白重新折叠而成为有活性的结构。业已证明，无论在有钙还是无钙情况下，芽胞杆菌植酸酶对木瓜蛋白酶、胰酶、胰蛋白酶都具有很强的抵抗力，即使在这些高浓度的蛋白酶作用后仍可保留 11%的酶活。然而，无论 Ca^{2+}存在与否，植酸酶却对胃蛋白酶相当敏感，这种敏感性可能是在低 pH 条件下植酸酶更容易变性的结果。

（7）芽胞杆菌植酸酶的催化机理

Powar 和 Jagannathan（1982）研究表明，内消旋肌醇环腺苷-磷酸是枯草芽胞杆菌植酸酶的终产物（磷酸根的位置未作测定）。但 Kerovuo 等（2000）认为，这是由于该酶制剂中含有一些非特异性磷酸酶引起的，当延长反应时间时这些酶可以将肌醇三磷酸水解成内消旋肌醇环腺苷一磷酸。他们认为，芽胞杆菌植酸酶只水解植酸中的 3 个磷酸基团，植酸酶趋向于水解每两个相邻磷酸基团中的一个，并产生两种不同的肌醇三磷酸终产物：2,4,6-肌醇三磷酸和 1,3,5-肌醇三磷酸。因此，底物类似物六硫酸肌醇对其他植酸

酶有较强的抑制作用，但对芽胞杆菌植酸酶的活性没有抑制作用。氟化物、钒酸盐结合氟化物、钒酸盐、底物植酸和底物类似物肌醇六硫酸的抑制试验和酶晶体结构研究表明，芽胞杆菌植酸酶的催化活性均不受上述物质的抑制，提示芽胞杆菌植酸酶具有不同于其他植酸酶的催化机理，需做进一步研究。综上所述，芽胞杆菌植酸酶是一类中性植酸酶，具有良好的热稳定性，其稳定性和活性对钙离子具有强烈的依赖性，表现出和其他植酸酶不同的催化机理，是一类新的植酸酶。加快利用现代生物技术对中性植酸酶进行研究与开发，使我国能自行生产成本低廉的中性植酸酶，对缓解磷资源缺乏、降低饲料成本、减少磷对环境的污染，具有良好的经济效益和生态环境效益。

（8）芽胞杆菌植酸酶的研究

国内学者研究过 3 种芽胞杆菌产植酸酶特性，综述如下。

1）胶质芽胞杆菌（*B. mucilaginosus*）。对胶质芽胞杆菌 D4B1 生理特性研究表明，菌株 D4B1 在供试培养基 A 中生长良好，12h 进入对数生长期，48h 达生长高峰，菌体浓度为 6.0×10^8 个/ml；对氨苄西林、卡那霉素、氯霉素、硫酸链霉素没有抗性；能分泌胞外活性物质从而抑制植物病原真菌的生长；具有较强的解磷解钾能力（吴作为等，2004）。

2）解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*）。采用 PCR 法从解淀粉芽胞杆菌 BA11 中克隆到一个中性植酸酶 *phyc* 基因，将该基因克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上，并电转化至宿主细胞 GS115 后进行诱导表达。SDS-PAGE 试验表明：该重组中性植酸酶在毕赤酵母宿主细胞中实现了高效分泌性表达。植酸酶活性测定结果显示阳性克隆子在诱导 72h 时酶活性达最高值，活性为 2330U/L（张建云等，2015）。

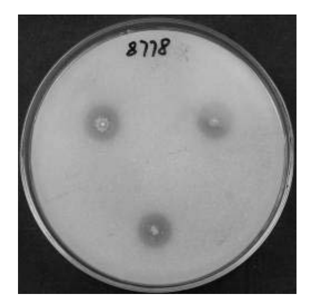
3）枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）。从 118 份样品中分离到一株产植酸酶的枯草芽胞杆菌（*B. subtilis* WHNB02），其发酵液经乙醇沉淀、硫酸铵分级沉淀及 Sephadex G-100 柱层析等步骤后分离纯化了该酶，纯化倍数约为 31.5 倍，回收率为 13.0%。该酶为单体酶，SDS-PAGE 测得其分子质量约为 43KDa，以植酸钠为底物的 K_m 值为 0.5mmol/L，酶反应的最适温度为 60℃，80℃作用 10min 酶活保存 61%，最适 pH 为 7.0，在 pH6.0～10.0 时稳定，EDTA、Mn^{2+}、Ba^{2+}（5mmol/L）对酶活具有很大的抑制作用（胡勇等，2005）。以产植酸酶枯草芽胞杆菌为菌种，在由棉粕 90g、玉米粉 10g 组成的发酵底物中接种菌液 7.0ml/100g；在温度为 37℃，时间为 72h，底物初始水分为 30%，初始 pH 为 7.0 的条件下进行发酵，评定枯草芽胞杆菌发酵产物中有效磷及常规营养成分的变化。试验发现，通过枯草芽胞杆菌发酵，棉粕源发酵饲料中有效磷含量提高 45.5%，差异极显著（$P<0.01$），植酸磷/总磷降低 13.2%，差异显著（$P<0.05$），植酸酶活性提高 103.72U/g，淀粉酶提高 24.43U/g，蛋白酶活性提高 23.21U/g，棉粕源生物蛋白饲料的营养价值均有不同程度的提高（鲍振国和张文举，2013）。枯草芽胞杆菌能通过分泌植酸酶分解植酸，释放磷元素，促进动植物磷的吸收。范继英和何月秋（2006）主要综述了枯草芽胞杆菌植酸酶作用机理、酶学性质、分离纯化、分类地位和基因工程方面的研究进展，以便为该酶的深入研究和应用提供借鉴。采用 PCR 法，获得不含有信号肽序列的来源于枯草芽胞杆菌的植酸酶 *phyC* 基因的非融合和融合表达片段，分别构建带有 T7*lac* 启动子的大肠杆菌的植酸酶 pET30NFphyC 和 pET30FphyC 表达载体，并转入大肠杆菌菌株 BL21（DE3）中。大肠杆菌分别在 30℃和 25℃经 IPTG 诱导后实现了植酸酶的表达，非融合和融合植酸酶

的表达量分别约占菌体总蛋白的 13%和 15%，分子质量分别为 40.13kDa 和 43.27kDa。表达产物具有植酸酶的生物学活性，非融合植酸酶和融合植酸酶的最适反应温度分别为 50℃和 75℃，经 90℃处理 10min，残留酶活性分别为 37℃时的 31.9%和 75.7%。分析表明，表达产物含 13 个氨基酸残基（吴琦等，2004）。从土壤中分离到产中性植酸酶的枯草芽胞杆菌并对所产植酸酶进行了分离纯化，此中性植酸酶的反应最适 pH 为 7.5，最适温度为 55℃，在 37℃下以植酸钠为底物的 K_m 值为 0.19mmol/L，植酸酶活性依赖 Ca^{2+} 的存在，酶蛋白的分子质量大小约为 45kDa，纯酶蛋白 N 端序列为 Lys-His-Lys-Leu-Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr（王亚茹和范云六，2001）。以产植酸酶的广谱拮抗生防枯草芽胞杆菌 T2 为初发菌株，经硫酸二乙酯（DES）诱变，得到遗传特性稳定的一株植酸酶负突变株 M3。采用有效磷限量、含 NaCl 150mmol/L 的植物生长水培液对小麦进行盐胁迫，在植酸存在的条件下，水培液中施加 T2 发酵液或植酸酶均可促进盐胁迫下小麦幼苗的生长，小麦株高、鲜重、叶片叶绿素含量和根系活力均得以增高，而植株丙二醛（MDA）含量降低。失去植酸酶活性的负突变株 M3 发酵液则不具有提高小麦株高鲜重和叶绿素含量的作用，对根系活力的提高和对 MDA 含量的降低程度也均低于 T2 发酵液处理。上述结果表明，生防枯草芽胞杆菌胞外植酸酶在增强小麦耐盐性方面起了重要作用（郭英等，2009）。植酸酶广泛存在于微生物、植物和动物中，但猪与家禽等单胃动物体内缺乏该酶。目前商品化的植酸酶均来源于微生物，主要有黑曲霉（*Aspergillus niger*）（EC3.1.3.8）、无花果曲霉（*A. ficuum*）（EC 3.1.3.5）和米曲霉（*A. oryzae*）（EC3.1.3.26）。另报道还有聚多曲霉菌（*A. sydowl*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtills*）及隔孢伏革菌（*Peniphora lycii*）等，但以黑曲霉和无花果曲霉的效率较高（张若寒等，2002；刘梅英等，2006）。根据已知的枯草芽胞杆菌 WHNl302 植酸酶 *phyC* 基因全序列设计一对引物，采用 PCR 法从含有该基因的 pUC18-phyC 质粒上获得了长约 1.1kb 不含有信号肽序列的植酸酶 *phyC* 基因表达片段。经 T 载体克隆及序列测定后，构建毕赤巴斯德表达载体 pPIc3.5K-phyC，并电转化毕赤巴斯德酵母宿主菌 GS115，经 MD 和 MM 平板筛选、酶活性测定，获得了阳性转化子，并进行了诱导表达。SDS-PAGE 分析表明：表达产物分子质量为 42.01kDa，表达量占细胞可溶性总蛋白的 24%，并具有植酸酶的生物学活性。酶学性质分析结果显示：胞内表达的植酸酶酶促反应最适 pH 为 7.5；最适反应温度为 70℃；经 90℃处理 10min，残留酶活性 42%，均优于初发菌株天然植酸酶的相应性质（吴琦等，2004）。以 phyC-PUC18-T 为模板，扩增出枯草芽胞杆菌中性植酸酶 *phyC* 基因，克隆至 T 载体中，经酶切鉴定及序列测定后重组入谷胱甘肽 S-转移酶融合表达载体 pGEX-4T-1 中，转化大肠杆菌菌株 JM109，重组质粒在宿主 JM109 中有较好的稳定性，在无选择压力条件下传代 45 次基本保持稳定，0.1mmol/L IPTG 诱导后活性测定结果表明，表达产物具有生物学活性。SDS-PAGE 结果显示出明显的特异性表达条带，分子质量为 69kDa，30℃诱导 3h 后，表达的目的蛋白量占菌体总蛋白的 47.4%（邹克扣等，2004）。利用转入枯草芽胞杆菌植酸酶基因的不同烟草株系，分别在无菌培养基、砂培和土培试验中研究了转植酸酶基因烟草对植酸磷的吸收和利用。结果表明，在无菌培养基试验中，所有转植酸酶基因烟草对植酸磷的吸收利用能力均显著高于野生型，其生物量比野生型提高了 3.6～10.7 倍，总磷吸收量提高 2.2～4.6 倍；在沙培和土培中，

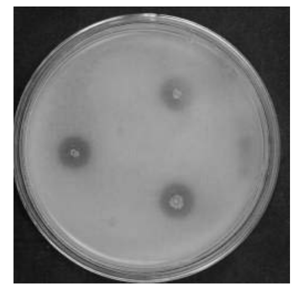
转植酸酶基因烟草对植酸磷的吸收利用与野生型相比，生物量和总磷吸收量差异不显著。这说明转植酸酶基因在无菌条件下可以提高植物吸收利用植酸磷的能力，但是在自然条件下，由于微生物分解或矿物固定等原因，其作用不稳定，需要进一步研究克服土壤中的限制因素，才能使转基因植物充分发挥作用（孔凡利等，2005）。以纳豆芽胞杆菌 JSU-2 为供试菌株，麦麸皮为唯一固体发酵基质，运用响应面法对其产植酸酶的条件进行优化。首先用部分因子试验设计对影响植酸酶活性的主要变量进行了评价，发现主要影响因子为麸皮与水的比例和培养时间。然后用中心组合试验设计确定主要变量的最佳水平。最佳产酶发酵条件为：粒径为 3mm、麸皮与水的比例为 1∶9.6、接种量为 3ml 和培养时间为 25h。在最佳产酶条件下进行发酵，得到的植酸酶活性为 595U/g 麦麸（刘玲玲和陈钧，2009）。

二、芽胞杆菌产植酸酶水解透明圈的测定

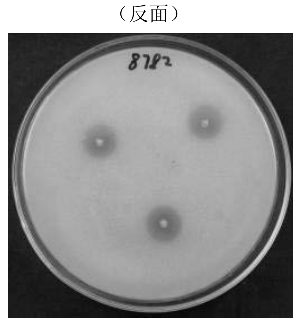
经实验观察测定，120 株标准芽胞杆菌中有 16 株菌的平板上有明显水解透明圈（图 2-101）。



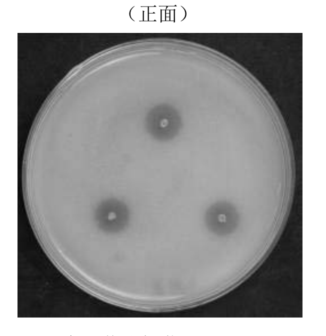
FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）（反面）



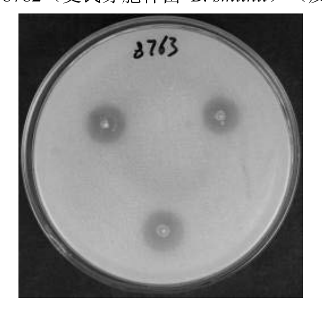
FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）（正面）



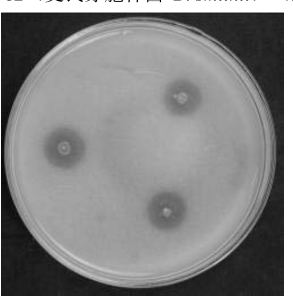
FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）（反面）



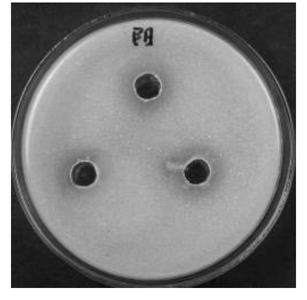
FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）（正面）

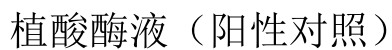


FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）（反面）



FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）（正面）




植酸酶液（阳性对照）

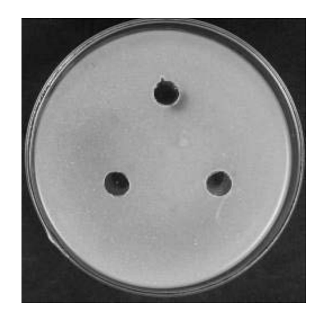

水 （阴性对照）

图 2-101　芽胞杆菌产植酸酶水解透明圈

三、芽胞杆菌植酸酶活性分析

芽胞杆菌植酸酶活性测定：利用水解透明圈初筛具有产植酸酶能力的 16 株芽胞杆菌菌株，而后，在 30℃、170r/min 恒温振荡摇床中培养 48h 后进行粗酶活性测定，见表 2-68。分析结果表明，芽胞杆菌植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值为 1.05～3.91，而植酸酶活性为 0.0253～0.1355U/ml。

表 2-68　芽胞杆菌植酸酶活性的测定

菌株名称	*H*/*C* 值	植酸酶活性/(U/ml)
FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）	1.05	0.0253
FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *Bacillus acidiproducens*）	1.13	0.0662
FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）	1.22	0.0112
FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）	1.22	0.0097
FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）	1.24	0.0448
FJAT-8790（土壤短芽胞杆菌 *Brevibacillus agri*）	1.24	0.0485
FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *Bacillus lehensis*）	1.27	0.0812
FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）	1.3	0.0066
FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）	1.31	0.0689
FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）	1.31	0.0008
FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）	1.32	0.0617
FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）	1.33	0.0447
FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）	3.02	0.1045
FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）	3.02	0.1355
FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）	3.34	0.1258
FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）	3.91	0.1124

四、芽胞杆菌植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

利用表 2-68 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对芽胞杆菌植酸酶水解透明圈

H/*C* 值进行聚类分析，分析结果见图 2-102，可以将 10 种芽胞杆菌产植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值分为两类。

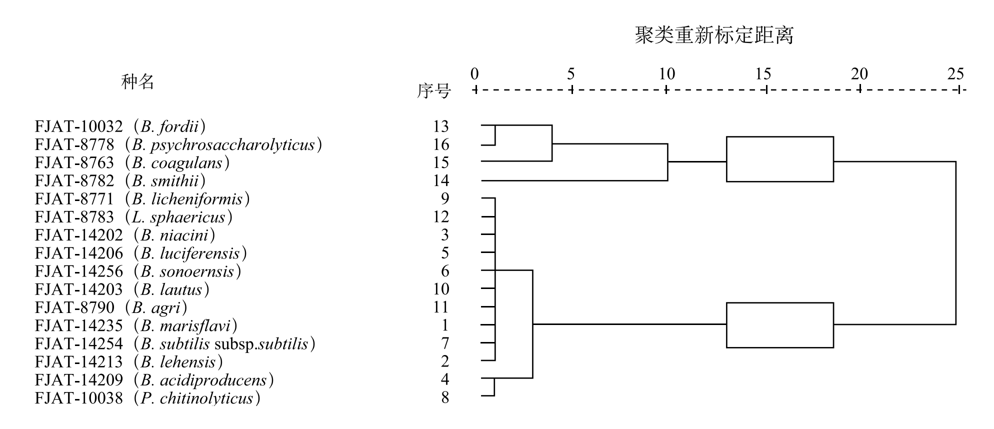


图 2-102　植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值聚类分析

第 1 类：植酸酶水解透明圈较大，*H*/*C* 值为 3.02～3.91，其包含了 4 种芽胞杆菌，即 FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）。

第 2 类：植酸酶水解透明圈较小，*H*/*C* 值为 1.05～1.32，其包括了 12 个芽胞杆菌，即 FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-8790（土壤短芽胞杆菌 *Brevibacillus agri*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）。

五、芽胞杆菌植酸酶活性聚类分析

利用表 2-68 数据，以欧氏距离为尺度，用类平均法对 16 种芽胞杆菌的植酸酶活性进行聚类分析，分析结果见图 2-103。芽胞杆菌植酸酶活性可以分为 3 类。

第 1 类：该类芽胞杆菌植酸酶活性较低，为 0.0008～0.0448U/ml，其包含了 7 种芽胞杆菌，即 FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-8790（土壤短芽胞杆菌 *Brevibacillus agri*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）。

第 2 类：芽胞杆菌植酸酶活性较高，为 0.0485～0.0812U/ml，其包含了 5 种芽胞杆菌，即 FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）、FJAT-14254（枯草

芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）。

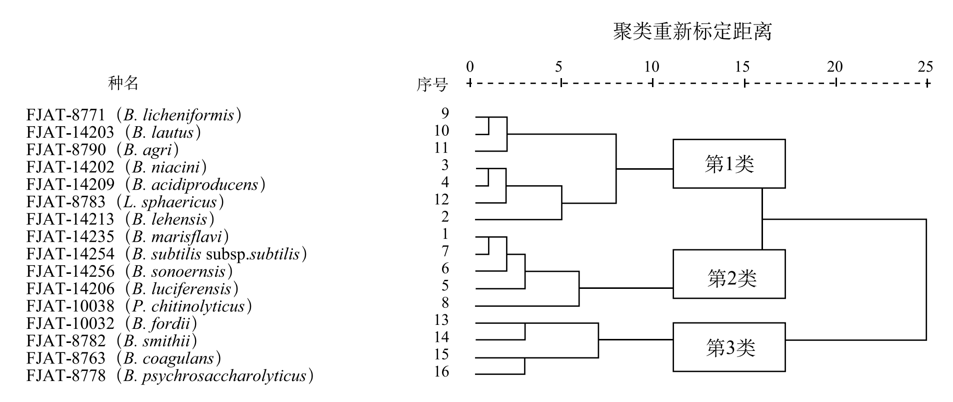


图 2-103　芽胞杆菌植酸酶活性聚类分析

第 3 类：芽胞杆菌植酸酶活性较高，为 0.1045～0.1355U/ml，其包含了 4 种芽胞杆菌，FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）。

六、芽胞杆菌植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值与酶活性相互关系

选择既测定过植酸酶水解透明圈，又测定了植酸酶活性的 16 种芽胞杆菌，建立数据矩阵。芽胞杆菌植酸酶水解透明圈与酶活性的相互关系存在两种类型：①芽胞杆菌植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而植酸酶活性低，如 FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*），*H*/*C* 值为 1.27，植酸酶活性为 0.0812U/ml；②芽胞杆菌植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值小而植酸酶活性高，如 FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*），*H*/*C* 值 3.02，植酸酶活性 0.1045U/ml。

以欧氏距离为尺度，用类平均法进行聚类分析，聚类图见图 2-104。基于植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值与植酸酶活性将芽胞杆菌分为两类。

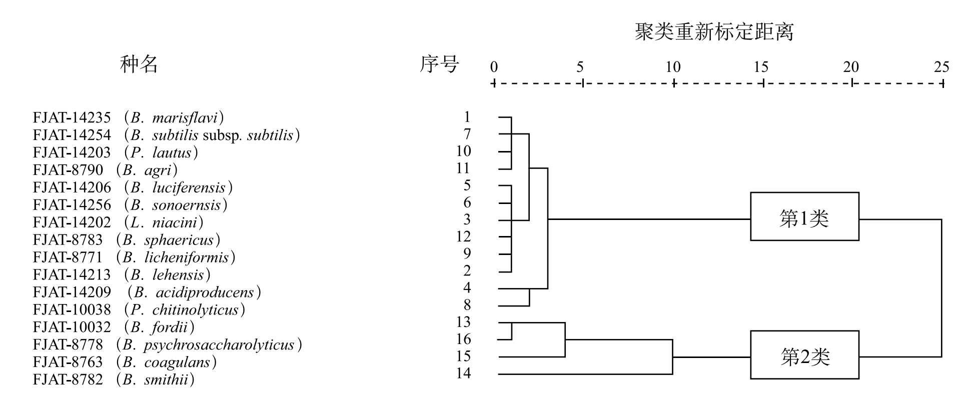


图 2-104　芽胞杆菌植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值与植酸酶活性的相互关系聚类分析

第 1 类：12 种芽胞杆菌聚为一类，其特点是植酸酶活性较低，为 0.008～0.0617U/ml，植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值较小，为 1.05～1.33，包括 FJAT-14213（列城芽胞杆菌 *B. lehensis*）、FJAT-14202（烟酸芽胞杆菌 *B. niacini*）、FJAT-14209（产酸芽胞杆菌 *B. acidiproducens*）、FJAT-8771（地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis*）、FJAT-14203（灿烂类芽胞杆菌 *P. lautus*）、FJAT-8790（土壤短芽胞杆菌 *Brevibacillus agri*）、FJAT-8783（球形赖氨酸芽胞杆菌 *L. sphaericus*）、FJAT-14235（黄海芽胞杆菌 *B. marisflavi*）、FJAT-14206（路西法芽胞杆菌 *B. luciferensis*）、FJAT-14256（索诺拉沙漠芽胞杆菌 *B. sonoernsis*）、FJAT-14254（枯草芽胞杆菌枯草亚种 *B. subtilis* subsp. *subtilis*）、FJAT-10038（解几丁质类芽胞杆菌 *P. chitinolyticus*）。

第 2 类：4 种芽胞杆菌聚为一类，其特点是植酸酶活性较高，为 0.1045～0.1355U/ml，植酸酶水解透明圈 *H*/*C* 值较大，为 3.02～3.91，包括 FJAT-10032（福氏芽胞杆菌 *B. fordii*）、FJAT-8782（史氏芽胞杆菌 *B. smithii*）、FJAT-8763（凝结芽胞杆菌 *B. coagulans*）、FJAT-8778（冷解糖芽胞杆菌 *B. psychrosaccharolyticus*）。

第三章　芽胞杆菌分子生物学特性

第一节　芽胞杆菌分子生物学研究方法

一、核酸探针检测技术

以核酸分子杂交技术为核心，利用探针分析 DNA 序列及片段长度多态性，探针是能与特定核苷酸序列发生特异性互补的已知核酸片段，它可以是长探针（100～1000bp），也可以是短核苷酸片段（10～50bp），可以是从 RNA 制备 cDNA 的探针，也可以是 PCR 产物或人工合成的寡核苷酸探针。根据碱基互补配对的原则，被标记（放射性或非放射性的）的核苷酸探针以原位杂交、Southern 杂交（印迹杂交、斑点印迹和狭线印迹杂交等不同的方法），可直接用来探测溶液中、细胞组织内或固定在膜上的同源核酸序列。核酸分子杂交的高度特异性及检测方法的高度灵敏性，使得核酸分子杂交技术广泛应用于对环境中的生物的检测，定性、定量分析它们的存在、分布、丰度和适应性等研究目标。基因探针方法学利用了 DNA 能变性和重退火的特性。要制作一个基因探针，必须清楚所研究的这个基因的 DNA 序列。这个基因对一特定的微生物种可能是独特的，在这种情况下，其 DNA 序列就有利于检出那种微生物体。或者，这个基因可能编码一种某一代谢途径独特的酶，从这样一种序列构建出的基因探针就有可能指示土壤或水样品中一群细菌的潜在活性。这类探针可定义为功能性基因探针。例如，由编码固氮作用的酶的 DNA 序列可制作基因探针，这样的探针就可以用于测估特定的土壤中是否含有携带固氮基因的细菌。随后，还可以构建另外的探针，用于测定这些机体实际上是根瘤菌属或固氮螺菌属的一些种，或者是蓝细菌。这一基因甚至可能对所有的细菌来说是通用的，因而使检出所有已知细菌成为可能。

二、基因引物 PCR 扩增技术

在分子生态学中，根据扩增的模板、引物序列来源及反应条件的不同可将 PCR 技术分为以下几种：①反转录 PCR 技术（RT-PCR），是在 mRNA 反转录之后进行的 PCR 扩增，可以用来分析不同生长时期的 mRNA 表达状况的相关性。②竞争 PCR（C-PCR），是一种定量 PCR，通过向 PCR 反应体系中加入人工构建的带有突变的竞争模板、控制竞争模板的浓度来确定目的模板的浓度，对目的模板做定量研究。③扩增的 rDNA 限制酶切分析技术（ARDRA），是美国最新发展起来的一项现代生物鉴定技术，它依据原核生物 rDNA 序列的保守性，将扩增的 rDNA 片段进行酶切，然后通过酶切图谱来分析菌间的多样性。④随机扩增多态性 DNA 技术（RAPD），是以一个通常为 10 碱基的寡核苷酸序列为引物，对基因组 DNA 随机扩增来鉴别多态性 DNA 的过程，RAPD 分析不需要生物 DNA 序列，而且 DNA 用量少，无种族特异性，不需要制备克隆、探针标记和分子

杂交等，是一种易推广应用的技术。⑤微卫星标记（microsatellite），又称为短串联重复序列（simple tandem repeat，STR）或简单重复序列（simple sequence repeat，SSR），是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列，由 2～6 个核苷酸的串联重复片段构成，由于重复单位的重复次数在个体间呈高度变异性并且数量丰富，因此微卫星标记的应用非常广泛。微卫星位点通常通过 PCR 扩增，扩增产物通过电泳分析并根据大小分离等位基因进行检测。微卫星 DNA 是真核生物基因组重复序列中的主要组成部分，主要由串联重复单元组成，每单元长度为 1～10bp，一个 SSR 的总长度可达几十到几百个碱基。每个微卫星 DNA 都由核心序列和侧翼序列组成，其核心序列呈串联重复排列。侧翼 DNA 序列位于核心序列的两端，为保守的特异单拷贝序列，能使微卫星特异地定位于染色体常染色质区的特定部位。PCR 扩增后的等位微卫星可以用多种方法检测，如荧光标记、银染。微卫星存在于大多数生物的基因组中，被广泛地应用于遗传杂交育种和绘制染色体遗传图谱等领域。高度多态的微卫星还可以用来在人群中进行个体识别。

三、全基因组序列测定分析

全基因组测序是对未知基因组序列的物种进行个体的基因组测序。Renato Dulbecco 是最早（1986 年）提出人类基因组测序的科学家之一。他认为如果能够知道所有人类基因的序列，对于癌症的研究将会很有帮助。美国能源部（DOE）与美国国家卫生研究院（NIH），分别在 1986 年与 1987 年加入人类基因组计划。除了美国之外，日本在 1981 年就已经开始研究相关问题，但是并没有美国那样积极。到了 1988 年，詹姆士·华生（DNA 双螺旋结构发现者之一）成为 NIH 的基因组部门主管。1990 年开始国际合作。1996 年，多个国家召开百慕大会议，以 2005 年完成定序为目标，分配了各国负责的工作，并且宣布研究结果将会及时公布，并完全免费。

1998 年，克莱格·凡特的塞雷拉基因组公司成立，而且宣布将在 2001 年完成定序工作。随后国际团队也将完成工作的期限提前。2000 年 6 月 26 日，塞雷拉公司的代表凡特，以及国际合作团队的代表弗朗西斯·柯林斯（Francis Collins），在美国总统克林顿的陪同下发表演说，宣布人类基因组的概要已经完成。2001 年 2 月，国际团队与塞雷拉公司，分别将研究成果发表于 *Nature* 与 *Science* 两份期刊。在基因组计划的研究过程中，塞雷拉基因组使用的是霰弹枪定序法（shotgun sequencing），这种方法较为迅速，但是仍需以传统定序来分析细节。全基因组测序技术主要包括第二代测序技术（NGS）和第三代测序技术。第二代测序技术已经能够快速、低成本地进行全基因组测序，其设备供应商主要是 Solexa（现被 Illumina 公司合并），454（罗氏公司）和 SOLiD（AB 公司）。第三代测序技术于 2011 年 4 月正式推广，其单分子实时（SMRT）测序技术完全不同于第二代测序，它的序列读长高达 3000bp（Pacific Biosciences 公司研发）。

（1）基因组测序技术路线

提取基因组 DNA，然后随机打断，电泳回收所需长度的 DNA 片段（0.2～5kb），加上接头，进行基因簇 cluster 制备或电子扩增 E-PCR，最后利用双端测序[Paired-End（Solexa）或者 Mate-Pair（SOLiD）]的方法对插入片段进行测序。对测得的序列组装成重叠群（Contig），通过双端测序（Paired-End）的距离可进一步组装成 Scaffold，进而

可组装成染色体等。组装效果与测序深度、覆盖度、测序质量等有关。常用的组装有SOAPdenovo、Trimity、Abyss 等。

（2）基因组测序指标

深度：测序深度（sequencing depth）是指测序得到的碱基总量（bp）与基因组大小的比值，它是评价测序量的指标之一。测序深度与基因组覆盖度之间是一个正相关的关系，测序带来的错误率或假阳性结果会随着测序深度的提升而下降。测序的个体，如果采用的是双末端或 Mate-Pair 方案，当测序深度为 50～100X 甚至以上时，基因组覆盖度和测序错误率控制均得以保证，后续序列组装成染色体才能变得更容易与精准。覆盖度：测序覆盖度是指基因组被测序得到的碱基覆盖的比例；测序覆盖度是反映测序随机性的一个指标；测序深度与覆盖度之间的关系可以通过 Lander-Waterman 模型（1988）来确定。当深度达 5X 时，则可覆盖基因组约 99.4%以上。

（3）基因组测序应用

通过生物信息手段，分析不同个体基因组间的结构差异，同时完成 SNP 及基因组结构注释。DNA 突变可诱发癌症。吸烟过程中所释放的>60 种致癌化学物质可与 DNA 结合并对 DNA 链上的鸟嘌呤和腺嘌呤进行化学修饰从而产生大的加合物，该加合物改变了 DNA 双螺旋的结构，如果不被核苷酸剪切修复或其他的途径进行纠正，那么 DNA 在复制时就会按照 non-Watson-Crick 方式进行复制并阻止 RNA 聚合酶进行转录，从而引发癌症。英国剑桥大学和 Wellcome Trust Sanger 研究所一起，于 2010 年年初，在 *Nature* 杂志上发表文章，他们用第二代测序技术（ABI SOLiD）对一个小细胞肺癌（small-cell lung cancer，SCLC）细胞系 NCI-H209 基因组进行测序，以探讨烟气中的致癌物质引发了该细胞系基因组中哪些特定碱基及其周围序列的突变，以及细胞损伤修复路径。

随着细菌基因组研究的迅速发展，全基因组测序已逐步成为微生物基础研究的重要手段之一。新一代高通量测序技术大大减少了基因组测序的成本和时间，让更多实验室可以开展微生物基因组测序项目。根据不同的研究目的和测序要求，细菌基因组测序可分为 3 种类型：细菌基因组 Scanning、细菌基因组精细图和细菌基因组完成图。关键技术包括了灵活应用 Roche 454 长片段测序、Illumina 短片段高覆盖测序、结合 454 双末端测序（paired-end）及 Illumina 末端配对测序（mate-pair sequencing）技术。

四、单核苷酸多态性分析

单核苷酸多态性 SNP，是指在基因组上单个核苷酸的变异形成的遗传标记，其数量很多，多态性丰富。基因组上单个核苷酸的变异，包括置换、颠换、缺失和插入。从理论上来看，每一个 SNP 位点都可以有 4 种不同的变异形式，但实际上发生的只有两种，即转换和颠换，二者之比为 1∶2。SNP 在 CG 序列上出现最为频繁，而且多是 C 转换为 T，原因是 CG 中的 C 常为甲基化的，自发地脱去氨基后即成为胸腺嘧啶。一般而言，SNP 是指变异频率大于 1%的单核苷酸变异。在人类基因组中大概每 1000 个碱基就有一个 SNP，人类基因组上的 SNP 总量大概是 3×10^6 个。因此，SNP 成为第三代遗传标志，人体许多表型差异、对药物或疾病的易感性等都可能与 SNP 有关。

SNP 研究是人类基因组计划走向应用的重要步骤。这主要是因为 SNP 将提供一个强

有力的工具，用于高危群体的发现、疾病相关基因的鉴定、药物的设计和测试及生物学的基础研究等。SNP 在人类基因组中广泛存在，平均每 500~1000 个碱基对中就有一个，估计其总数可达 300 万个甚至更多。大量存在的 SNP 位点，使人们有机会发现与各种疾病，包括肿瘤相关的基因组突变；从实验操作来看，通过 SNP 发现与疾病相关的基因突变要比通过家系研究容易；有些 SNP 并不直接导致疾病基因的表达，但由于它与某些疾病基因相邻，而成为重要的标记。SNP 在基础研究中也发挥了巨大的作用，通过对 Y 染色体 SNP 的分析，使得人们在人类进化、人类种群的演化和迁徙领域取得了一系列重要成果。

单核苷酸多态性，主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。它是人类可遗传的变异中最常见的一种，占所有已知多态性的 90%以上。SNP 所表现的多态性只涉及单个碱基的变异，这种变异可由单个碱基的转换或颠换引起，也可由碱基的插入或缺失所致，但通常所说的 SNP 并不包括后两种情况。

从理论上讲，SNP 既可能是二等位多态性，也可能是 3 个或 4 个等位多态性，但实际上，后两者非常少见，几乎可以忽略。因此，通常所说的 SNP 都是二等位多态性的。这种变异可能是转换（C T，在其互补链上则为 G A），也可能是颠换（C A、G T、C G、A T）。转换的发生率总是明显高于其他几种变异，具有转换型变异的 SNP 约占 2/3，其他几种变异的发生概率相似。Wang 等（2007）的研究也证明了这一点。转换的概率之所以高，可能是因为 CpG 二核苷酸上的胞嘧啶残基是人类基因组中最易发生突变的位点，其中大多数是甲基化的，可自发地脱去氨基而形成胸腺嘧啶。

在基因组 DNA 中，任何碱基均有可能发生变异，因此 SNP 既有可能在基因序列内，也有可能在基因以外的非编码序列上。总体来说，位于编码区内的 SNP（coding SNP，cSNP）比较少，因为在外显子内，其变异率仅为周围序列的 1/5。但它在遗传性疾病研究中具有重要意义，因此 cSNP 的研究更受关注。从对生物的遗传性状的影响上来看，cSNP 又可分为两种：一种是同义 cSNP（synonymous cSNP），即 SNP 所致的编码序列的改变并不影响其所翻译的蛋白质的氨基酸序列，突变碱基与未突变碱基的含义相同；另一种是非同义 cSNP（non-synonymous cSNP），是指碱基序列的改变可使以其为模板翻译的蛋白质序列发生改变，从而影响了蛋白质的功能。这种改变常是导致生物性状改变的直接原因。cSNP 中约有 1/2 为非同义 cSNP。先形成的 SNP 在人群中常有更高的频率，后形成的 SNP 所占的比率较低。各地各民族人群中特定 SNP 并非一定都存在，其所占比率也不尽相同，但大约有 85%应是共通的。

SNP 自身的特性决定了它更适合于对复杂性状与疾病的遗传解剖，以及基于群体的基因识别等方面的研究：①SNP 数量多，分布广泛。据估计，人类基因组中每 1000 个核苷酸就有一个 SNP，人类 30 亿碱基中共有 300 万以上的 SNP。SNP 遍布于整个人类基因组中，根据 SNP 在基因中的位置，可分为基因编码区 SNP（coding-region SNP，cSNP）、基因周边 SNP（perigenic SNP，pSNP）及基因间 SNP（intergenic SNP，iSNP）3 类。②SNP 适于快速、规模化筛查。组成 DNA 的碱基虽然有 4 种，但 SNP 一般只由两种碱基组成，所以它是一种二态的标记，即二等位基因。 由于 SNP 的二态性，非此即彼，在基因组筛选中 SNP 往往只需+/–的分析，而不用分析片段的长度，这就利于发展自动

化技术筛选或检测 SNP。③SNP 等位基因频率容易估计。采用混合样本估算等位基因的频率是一种高效快速的策略。该策略的原理是：首先选择参考样本制作标准曲线，然后将待测的混合样本与标准曲线进行比较，根据所得信号的比例确定混合样本中各种等位基因的频率。④易于基因分型。SNP 的二态性，也有利于对其进行基因分型。对 SNP 进行基因分型包括 3 个方面的内容：①鉴别基因型所采用的化学反应，常用的技术手段包括：DNA 分子杂交、引物延伸、等位基因特异的寡核苷酸连接反应、侧翼探针切割反应及基于这些方法的变通技术。②完成这些化学反应所采用的模式，包括液相反应、固相支持物上进行的反应及二者皆有的反应。③化学反应结束后，需要应用生物技术系统检测反应结果。

五、基因芯片检测技术

基因芯片（gene chip）（又称为 DNA 芯片、生物芯片）的原型是 20 世纪 80 年代中期提出的。基因芯片的测序原理是杂交测序方法，即通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法，在一块基片表面固定了序列已知的八核苷酸的探针。当溶液中带有荧光标记的核酸序列 TATGCAATCTAG，与基因芯片上对应位置的核酸探针产生互补匹配时，通过确定荧光强度最强的探针位置，获得一组序列完全互补的探针序列。据此可重组出靶核酸的序列。

基因芯片又称为 DNA 微阵列（DNA microarray），可分为 3 种主要类型：①固定在聚合物基片（尼龙膜、硝酸纤维膜等）表面上的核酸探针或 cDNA 片段，通常用同位素标记的靶基因与其杂交，通过放射显影技术进行检测。这种方法的优点是所需检测设备与目前分子生物学所用的放射自显影技术相一致，相对比较成熟。但芯片上探针密度不高，样品和试剂的需求量大，定量检测存在较多问题。②用点样法固定在玻璃板上的 DNA 探针阵列，通过与荧光标记的靶基因杂交进行检测。这种方法点阵密度可有较大的提高，各个探针在表面上的结合量也比较一致，但在标准化和批量化生产方面仍有不易克服的困难。③在玻璃等硬质表面上直接合成的寡核苷酸探针阵列，与荧光标记的靶基因杂交进行检测。该方法把微电子光刻技术与 DNA 化学合成技术相结合，可以使基因芯片的探针密度大大提高，减少试剂的用量，实现标准化和批量化大规模生产，有着十分重要的发展潜力。它是在基因探针的基础上研制出的，所谓基因探针只是一段人工合成的碱基序列，在探针上连接一些基因芯片可检测的物质，根据碱基互补的原理，利用基因探针到基因混合物中识别特定基因。它将大量探针分子固定于支持物上，然后与标记的样品进行杂交，通过检测杂交信号的强度及分布来进行分析。基因芯片通过应用平面微细加工技术和超分子自组装技术，把大量分子检测单元集成在一个微小的固体基片表面，可同时对大量的核酸和蛋白质等生物分子实现高效、快速、低成本的检测和分析。由于尚未形成主流技术，生物芯片的形式非常多，以基质材料分为尼龙膜、玻璃片、塑料、硅胶晶片、微型磁珠等；以所检测的生物信号种类分为核酸、蛋白质、生物组织碎片甚至完整的活细胞；按工作原理分类，有杂交型、合成型、连接型、亲和识别型等。由于生物芯片概念是随着人类基因组的发展一起建立起来的，因此至今为止生物信号平行分析最成功的形式是以一种尼龙膜为基质的“cDNA 阵列”，用于检测生物样品中基因表

达谱的改变。

第二节　芽胞杆菌系统发育标记基因

一、概述

芽胞杆菌是一种革兰氏阳性菌，能够产生对热、紫外线、电磁辐射和某些化学药品具有强抗性的芽胞，能在多种不良环境下存活，分化形成具有特殊功能的菌株。因此，芽胞杆菌在工业、农业、医学、科学领域中被广泛应用，为了更高效地利用芽胞杆菌资源，对芽胞杆菌系统学进行研究，对其分类鉴定方法进行改进就非常必要。

自 20 世纪 90 年代以来，分子生物学方法在芽胞杆菌的分类鉴定中得到广泛应用，如 DNA-DNA 杂交同源性分析、G+C 含量分析、16S rRNA 序列分析等。16S rRNA 因进化速率缓慢，基因产物功能保守，其序列分析是目前细菌主要的系统发育分类方法。但 16S rRNA 分子较小，包含的信息量也较少，对于亲缘关系较近的细菌一般分辨率较低，存在一定的局限性，只能在属的水平上大概区分细菌，种水平的分类单元一般通过 DNA-DNA 杂交来鉴定。但 DNA-DNA 杂交不仅操作复杂，而且操作过程受很多因素影响，因此杂交结果不稳定。随着科学技术的发展，利用系统发育标记基因进行芽胞杆菌的鉴定越来越多，即以进化速率不同的分子为研究对象，进行芽胞杆菌系统发育关系分析。近年来，不断有新的分子标记基因被发现并使用。分子标记基因可以反映生物个体或种群基因组中某种特异性 DNA 片段的差异，一般所选择的靶基因主要分为两类，即非蛋白质编码基因与蛋白质编码基因，作为分子标记应具备的条件（侯晓丽和陈智，2005）：基因普遍存在于各种细菌中；对于特殊的生长条件不显示适应性突变；不发生水平转移。目前，使用最广泛的非蛋白质编码基因为 16S rRNA 基因序列分析，一般可以对亲缘关系较远的菌株进行鉴定。蛋白质编码基因，可以同时从氨基酸和核酸两个水平信息系统进行分析，如热激蛋白（HSP）相关基因（*hsp65*、*hsp70* 等）、重组蛋白基因（*recA* 等）、延长因子 *Tu* 基因、部分 RNA 聚合酶基因（*rpoB*、*rpoD* 等）和 DNA 拓扑异构酶Ⅱ的 *gyrB*（郝云婕和韩素贞，2008），对亲缘关系较近的菌株的鉴定显示了较大的优越性。

二、*gyrB* 基因

（1）*gyrB* 基因编码的蛋白质及其功能

gyrB 基因即促旋酶（gyrase）B 亚单位基因，为大小为 2kb 的单拷贝持家基因，该基因高度保守，进化较快，平均每 5000 万年单核苷酸碱基对变化一次。细菌 DNA 促旋酶由两种亚单位组成（安然等，2010），A 亚基（*gyrA*）和 B 亚基（*gyrB*），酶的活性结构是两个 A 亚基和两个 B 亚基组成的四聚体，目前还没有发现两者之间有连接体。其中 B 亚基是由 *gyrB* 基因编码，分子质量约 90kDa 或 70kDa，具有 DNA 依赖的 ATP 酶活性，催化 ATP 的水解。DNA 促旋酶属于信息通路中与 DNA 复制、限制、修饰或修复有关的编码蛋白质。在大多数细菌中，以单拷贝的形式存在于细菌基因组中，编码的是唯一一种能诱导 DNA 负超螺旋的拓扑异构酶——DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白 GYRB。

它是一种细菌Ⅱ型拓扑异构酶，在 DNA 复制及 DNA 超螺旋结构的维持过程中起着重要的作用。

（2）*gyrB* 基因在芽胞杆菌系统发育分析中的应用

gyrB 基因是目前细菌分类鉴定中系统发育标记的典型代表。自从 Yamamoto 等于 1995 年设计出通用引物并从许多革兰氏阳性和革兰氏阴性菌中成功扩增出 *gyrB* 基因后，由于 *gyrB* 基因不显现频繁的基因横向转移，并且基于该基因的序列分析与 DNA-DNA 杂交的同源性分析有较好的一致性，*gyrB* 基因在芽胞杆菌的系统发育分析及菌株鉴定中被广泛使用，一般对该基因进行测序或对其 PCR 产物进行 RFLP 分析。*gyrB* 基因的进化和细菌间的分子起源：分子系统研究的模式分子通过构建 *gyrB* 和 16S rRNA 基因的系统进化树展示了细菌间的进化关系，证明了基于 *gyrB* 基因的进化树在决定沙雷氏菌之间的系统进化中比 16S rRNA 更可靠，16S rRNA 在描述远源细菌间的关系中比较有用，而 *gyrB* 基因在细菌分子间和分子内的系统分析中更具有参考价值。在枯草芽胞杆菌组的鉴定中（Wang *et al.*，2007），通过对同组芽胞杆菌的 16S rRNA 序列及 *gyrB* 基因和 DNA-DNA 杂交基因的序列相似性进行比较，*gyrB* 基因与 16S rRNA 序列的相似性较低，而和 DNA-DNA 杂交有较好的一致性，可见 *gyrB* 基因可以作为枯草芽胞杆菌的有效分类鉴定的方法。为了鉴定食物中的菌（Manzano *et al.*，2003），利用 PCR 技术结合限制性内切酶技术，所选芽胞杆菌用 GenBank 中的引物对 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增，用 *Rsa* Ⅰ、*Sau*3AⅠ和 *EcoR* Ⅰ等限制性内切酶消化，论证了用 *gyrB* 基因特异性序列鉴别食物中蜡状芽胞杆菌组的可能性。*gyrB* 基因的 PCR-Sau3AI 指纹图谱也可以鉴定苏云金芽胞杆菌（Awad *et al.*，2007），正如 Yamada 等（1999）的报道，它避免了使用 3 种特殊的引物进行菌株的鉴定。

基于 *gyrB* 基因的数据库 ICB（Wtanabe *et al.*，2001），为 *gyrB* 基因作为进化和分类标记提供了参考点和研究平台。不仅包括菌株的核苷酸和氨基酸信息，可以进行不同分类水平的序列比对，还提供菌株鉴定的引物选择和背景信息。Bavykin 等（2004）利用 16S rRNA、23S rRNA 和 *gyrB* 基因序列研究了蜡状芽胞杆菌组的进化关系，对蜡状芽胞杆菌组 183 株和 74 株菌分别进行了 16S rRNA 和 23S rRNA 序列分析，并对 30 株经过 16S rRNA 鉴定的该组菌进行 *gyrB* 序列分析，结果蜡状芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌三种基因序列分析都表现出异质性，而炭疽芽胞杆菌表现出同源性，证明了 *gyrB* 基因序列分析可以把炭疽芽胞杆菌从蜡状芽胞杆菌组中分离出来。Soufiane 和 Côté（2009）在鉴定 H 血清型苏云金芽胞杆菌时对 16S rRNA、*gyrB* 和 *aroE* 基因序列分析，三种基因都可以鉴定 H 血清型苏云金芽胞杆菌，而 *gyrB* 和 *aroE* 基因显示了极大的优势，*gyrB* 基因可以作为从 H 血清型苏云金芽胞杆菌和同一血清型苏云金芽胞杆菌中鉴定菌株的最佳标记基因。基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱作为一种蛋白质分析鉴定细菌的工具（Dickinson *et al*., 2004），在短小芽胞杆菌的鉴定中对其功能的验证不仅利用 16S rRNA 基因进行鉴定，更进一步用 *gyrB* 基因进行了鉴定。在鉴定新月红色进口火蚁中的芽胞杆菌时，*gyrB* 基因与 GenBank 基因序列相比达到 95.48%～100%的匹配值（Gunawan *et al*., 2008），由此可见在芽胞杆菌鉴定中 *gyrB* 基因的使用是很广泛的。

三、*rpoB*基因

（1）*rpoB* 基因编码的蛋白质及其功能

rpoB 基因编码 RNA 聚合酶的 β 亚单位，作为菌株鉴定和系统进化的标记。基于 *rpoB* 基因的 RT-PCR 已被用作鉴定蜡状芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌（Qi *et al.*，2001；Ellerbrok *et al.*，2002），尤其在鉴别蜡状芽胞杆菌组的炭疽芽胞杆菌中使用较多。部分 *rpoB* 基因序列，位于进行 RT-PCR 的下游区域，它包括一段利福平耐药性区段（Nicholson and Maughan，2002；Thwaite *et al.*，2002），可以进行炭疽芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌等的基因型比较分析。韩国学者 Ko 等（2003）对炭疽芽胞杆菌及其近缘种蜡状芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌的 *rpoB* 基因进行了序列比较分析，系统进化分析表明，炭疽芽胞杆菌分为单独的一支，因此认为 *rpoB* 基因可作为毒性炭疽芽胞杆菌有效快速的鉴定方法。明胶产品的污染是目前备受人们关注的问题，产品经过高温处理后仍存在细菌污染，Clerck 等（2004）从明胶半成品提取物中分离到 1129 株菌，通过 16S rDNA 进行初步筛选，后通过 *gyrA* 和 *rpoB* 序列的 rep-PCR 技术进行鉴定，大多数菌株被鉴定为芽胞杆菌。多项研究均充分验证了 *rpoB* 基因在枯草芽胞杆菌组及其相关菌株的鉴定中是非常有效的（Fox *et al.*，1992；Chun and Bae，2000）。

（2）*rpoB* 基因在芽胞杆菌系统发育分析中的应用

基于 *rpoB* 基因的微生物群落分析表明 16S rDNA 在种内鉴定存在局限性（Dahllof *et al.*，2000）。如今 *rpoB* 基因在医学、临床诊断和生态研究、环境监测等方面已被广泛使用，一般结合限制性片段长度多态性和多项分析进行研究。临床上使用 *rpoB* 基因检测炭疽芽胞杆菌（陈苏红等，2003），根据复合探针荧光定量分析原理，以炭疽芽胞杆菌染色体上的 *rpoB* 基因为靶序列，设计合成引物和探针，进行实时定量聚合酶链反应（PCR）检测，该法检测炭疽芽胞杆菌的灵敏度很高，能特异区分炭疽芽胞杆菌与其他蜡状芽胞杆菌。*rpoB* 基因代替 16S rDNA 用来鉴定固氮类芽胞杆菌（Mota *et al.*，2004），可以结合多重 PCR 等技术把炭疽芽胞杆菌从蜡状芽胞杆菌中分离出来。Meintanis 等（2008）运用 REP-PCR 和 BOX-PCR 技术对 *Geobacillus* 属菌株及芽胞杆菌模式菌株的 *rpoB* 基因序列进行了相似性分析，进化树分析表明，*rpoB* 基因序列相似性远低于 16S rDNA 序列相似性，因此，基于 *rpoB* 基因的 REP-PCR 和 BOX-PCR 技术可以进行 *Geobacillus* 属的分子分型，*rpoB* 基因是 *Geobacillus* 属优于 16S rDNA 的准确有效的鉴定方法。Ki 等（2009）则将 20 株分离自海洋环境的芽胞杆菌通过 16S rDNA 序列比较分为 13 个基因型和 9 个种，而基于 *rpoB* 基因的进化树是 16S rDNA 的 4.5 倍，说明 *rpoB* 的基因多态性可以作为芽胞杆菌鉴定的标记。为了克服 16S rDNA 鉴定 *Geobacillus* 属菌株的局限性，Weng 等（2009）也通过 *recA* 和 *rpoB* 基因序列比较对 *Geobacillus* 属菌株进行了进化分析和分子鉴定，*rpoB* 基因序列分型显示了更高的一致性，以此可以作为 *Geobacillus* 属高效便捷的鉴定方法。

四、*gyrA* 基因

gyrA 即促旋酶（gyrase）的 A 亚单位基因，它和 DNA 促旋酶 *gyrB* 基因相连。A 亚

基由 *gyrA* 编码，分子质量约 100kDa，具有磷酸二酯酶活性，负责 DNA 断裂和重接。由于其具有与 *gyrB* 基因类似的结构和功能，因此可以作为菌株系统发育标记。中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）采用 *gyrA* 基因序列分析技术，对其保存的 36 株枯草芽胞杆菌菌群进行系统发育分析，得到与 16S rRNA 基因序列分析一致的拓扑结构系统发育树，位于 3 个不同的系统发育分支间菌株的 *gyrA* 基因序列相似度为 75.3%～95.3%，远低于 16S rRNA 基因序列相似度。*gyrA* 基因序列分析对枯草芽胞杆菌群菌种的分辨率高于 16S rRNA 基因，充分显示了该基因于来鉴定芽胞杆菌的优势，因此有望成为工业用枯草芽胞杆菌菌种鉴定的一个有力工具。*gyrA* 基因在其他相关芽胞杆菌的鉴定中也显示了相对于 16S rRNA 序列分析的优势及与 DNA-DNA 杂交的一致性。

五、σ 因子

枯草芽胞杆菌 RNA 聚合酶至少以 5 种聚合酶的形式存在（Johnson *et al.*，1983），尤其是在细胞内，每种酶对应一种 σ 因子作为特异性启动子。RNA 聚合酶的主要形式为 43 000Da 的 σ 因子，是由 *rpoD* 基因编码的，与大肠杆菌 RNA 聚合酶的主要 σ 因子同源。枯草芽胞杆菌聚合酶 σ^{43} 包括 3 个基因 *P23*、*dnaE* 和 *rpoD*（σ^{43}），3 个基因紧密连在一起。在细菌生长的不同时期，两个重叠 σ^{43} 启动子控制操纵子的表达，而 σ^{37} 启动子在孢子形成时期调节操纵子的表达。

六、*rpoD* 基因

rpoD 基因处于 *aroD* 和 *lys* 基因之间，与 *dnaE* 基因相连，属于 *crsA* 基因的一部分，其基因序列为 *acf-aroD-dnaE-rpoD*（*crsA*）*-spoOG-lys*。*rpoD* 基因的上游编码区为 *dnaE* 基因，它编码 62 000Da 的蛋白质，该蛋白质对 DNA 复制是非常重要的，并且两个基因在染色体上为同方向逆时针转录，因此，*rpoD* 基因的功能和结构与大肠杆菌的操纵子相似（Losick and Pero，1981；Tanaka *et al.*，1988）。研究表明，基于氨基酸序列合成的核酸探针在大肠杆菌和枯草芽胞杆菌主要 σ 因子的合成中是非常保守的，可以用来鉴定不同真细菌的 *rpoD* 同源基因。在大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的假定编码区和主要的 σ 因子区有 13 个氨基酸序列是非常普遍的，可以作为 σ 因子和主要 σ 因子的特征。这些基因被命名为 *hrdA*、*hrdB*、*hrdC* 和 *hrdD*。据此设计的探针在检测各种真细菌 *rpoD* 基因的同源性时显示了很好的杂交信号。可见 *rpoD* 基因也是比较保守的，它特殊的结构和功能决定了 *rpoD* 基因可以作为系统发育标记。*rpoD* 基因在芽胞杆菌鉴定中应用较少，Takayuki 和 Hirosuke（2007）在鉴定 *Erwinia amylovora* 时对 16S rRNA、*gyrB* 和 *rpoD* 基因等分子标记进行了分析，证明了 *rpoD* 基因在细菌鉴定中的优势。

七、*cry* 基因

苏云金芽胞杆菌（Bt）制剂是目前国内外应用最广泛的微生物杀虫剂，其杀虫的主要活性成分是由杀虫蛋白基因（*cry* 基因）编码，并于营养期或芽胞形成期产生杀虫晶体蛋白（ICPs）。根据 Schnepf 等（1998）确立的新的分类规则，它们分别被确立为 53 个群、169 类、386 个亚类杀虫蛋白基因，因此 *cry* 基因家族成为苏云金芽胞杆菌鉴定的金

标准。赵银娟和魏炜（2008）从连云港海域中筛选出一株较有潜力的高活性 Bt 菌株，对其生物学特性进行了研究，同时也用 *cry* 基因证实了该菌的特殊性。枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌、短小芽胞杆菌和环状芽胞杆菌是 5 种环保微生物制剂中常用的芽胞杆菌，针对这些菌的传统理化检测方法费时费力，程琳琳等（2009）建立了一种快速、准确的检测方法，不仅使用 GenBank 上已有 *gyrB* 基因序列分别设计和筛选上述菌种的特异性引物，还利用 *rpoB*、*gdh* 系统发育标记经优化建立了快速有效的 PCR 检测方法。炭疽芽胞杆菌含有毒性质粒基因 *pXO2*，可以使细菌产生荚膜，*pXO2* 上的 *cap* 基因在鉴定炭疽芽胞杆菌中已被使用，陈苏红等（2003）为建立一种简便的炭疽芽胞杆菌检测方法作为临床诊断工具，以 *pXO1* 质粒上的 *pag* 基因及 *pXO2* 上的 *cap* 基因为靶标合成特异引物，进行定量 PCR 扩增来检测目的产物，该法检测炭疽芽胞杆菌的灵敏度很高，并且能区分炭疽芽胞杆菌与其他蜡状芽胞杆菌。*parE* 基因为拓扑异构酶Ⅳ的编码基因（Tourova *et al.*，2010），可以对嗜热菌属的菌株进行鉴定，作为持家基因在地衣芽胞杆菌组的鉴定中也被用作标记基因。Hua 等（2007）在 16S rRNA 鉴定的基础上通过持家基因 *gyrB* 和 *parE* 分别验证了日本和敦煌两个地区枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌的同源性，证明了东亚北部黄土转运微生物事件。

基因的系统发育分析在细菌分类鉴定中占有重要地位。随着分子生物学和测序技术的发展，DNA 大规模测序得以进行，传统鉴定细菌的方法，在某些方面被一种可定量、较精确的以可翻译核苷酸序列为基础的分析方法取代。因此，以核苷酸序列为基础的分析，要求选择合适的靶基因进行比较分析。适合于系统发育研究的保守基因在其进化过程中都面临着巨大的选择压力，非编码蛋白质基因如 16S rRNA 基因与蛋白质编码基因相比，不同之处是在进化过程中受到不同的约束条件，蛋白质编码基因由于密码子的简并性，具有更大的变化，在细菌的鉴定中提供了更精确的信息，因此，在菌株分类鉴定中已被频繁利用，*gyrB*、*rpoB*、*gyrA* 和 *parE* 等基因在不同种芽胞杆菌的鉴定中各有优势。基于基因序列标记的芽胞杆菌系统发育分析等研究目前已广泛展开，但是，要想获得更精确的分子标记仍然需要不断研究和探索。随着测序技术的发展，细菌基因序列的分析和比对逐渐变得较为容易，因此将不断深入研究应用分子标记基因进行系统发育分类。

第三节　短短芽胞杆菌功能基因分析

一、概述

以短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）为例，进行芽胞杆菌功能基因分析。短短芽胞杆菌细胞壁结构简单，分泌蛋白质能力强，不含内毒素，具有临床和环境方面的安全性（Cook，1993；Cook *et al.*，1996）。由于其可形成抗逆性强的芽胞，提高了短短芽胞杆菌的环境适应能力和与土著微生物的竞争力，这些优点都为短短芽胞杆菌的广泛应用提供了便利。短短芽胞杆菌应用范围非常广泛，主要包括生物防治、环境治理、工业生产和有毒物质降解等。但由于目前对其功能基因的研究还不是很透彻，因而造成了对

其作用机理无法深入探究。

二、短短芽胞杆菌分子检测

细菌分类方法主要包括 GC 含量测定、DNA 杂交和 16S rDNA 序列分析等。但短芽胞杆菌属的菌种间 GC 含量差异较大，为 47%～55%（Udaka *et al.*，1989），因此 Udaka 和 Yamagata（1993）利用 DNA-DNA 杂交及细胞脂肪酸组成、醌组成及免疫分析进行了短芽胞杆菌属的菌种的分类。随着分子生物学技术的迅速发展，Shida 等（1996）利用已得到的短芽胞杆菌属的 16S rDNA 序列（图 3-1），设计出一对引物用于短芽胞杆菌属的菌株检测，引物序列分别为 Brev174F：5'AGACCGGGATAACATAGGGAAACTTAT3'；1377R：5'GGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC3'，并在短芽胞杆菌的分类中成功应用。

图 3-1　短芽胞杆菌属 16S rDNA 引物设计（Shida *et al.*，1996）

三、短短芽胞杆菌全基因组

目前，全世界范围内，已完成两株短短芽胞杆菌基因组序列，其中一株是福建省农业科学院农业生物资源研究所筛选得到的具有微生物保鲜功能的短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX，总长为 6Mb，预测得到 5666 个基因，平均长度 933bp，基因密度达 87.83%，基因组 GC 含量为 47.30%（车建美，2011）。另一株为短短芽胞杆菌 NBR100599（http：//www.ncbi.nlm. nih.gov/ genomeprj/ 29147），其基因组序列总长为 6.3Mb，预测得到 6121 个基因，基因组 GC 含量为 47.30%。

四、短短芽胞杆菌 *Bdb* 基因

Bdb 基因是巯基-二硫化物氧化还原酶基因。二硫键在一些功能蛋白中起着很重要的作用，二硫键在试管中可以自发合成，但是其合成速率较生物体中慢（Peters and Davidson，

1982），因此推断，生物体中存在催化二硫键形成的基因或蛋白质。在大肠杆菌中发现 *DsbA* 基因，*DsbA* 蛋白是大肠杆菌的周质蛋白，但其含有一段 Cys-Pro-His-Cys 多肽序列，此序列与硫氧还蛋白和二硫化物异构酶蛋白活性位点结构相似。*DsbA* 基因突变体会造成一些周质蛋白的缺失，如碱性磷酸酶、外膜蛋白 A（OmpA）、β-内酰胺酶和鞭毛基体的 P-环蛋白（Dailey and Berg，1993）等缺失。

Ishihara 等（1995）从短短芽胞杆菌中克隆出编码二硫化物氧化还原酶的 *Bdb* 基因，*Bdb* 基因的序列见图 3-2，序列长度为 354bp，是编码 117 个氨基酸残基的多肽，N 端 27 个氨基酸残基具有典型的分泌型信号肽的特征，并且具有二硫化物氧化还原酶的保守结构：Cys-X-X-Cys，该结构是二硫氧化还原酶的活性中心（Peters and Davidson，1982），*Bdb*、*DsbA* 和 *PDI* 均存在此结构。为了验证 *Bdb* 基因的功能，将 *Bdb* 基因转入 *DsbA* 基因缺失的大肠杆菌中，因 *DsbA* 基因缺失的大肠杆菌不能借助鞭毛自由移动，因此 Tatsuya 等（1995）选用大肠杆菌的 *DsbA* 缺失突变体作为克隆表达的受体，将短短芽胞杆菌 *Bdb* 基因转入大肠杆菌内，观察大肠杆菌的行为变化和碱性磷酸酶活性，结果重组 *Bdb* 基因的大肠杆菌恢复了自由移动的能力，并且碱性磷酸酶的活性明显升高。

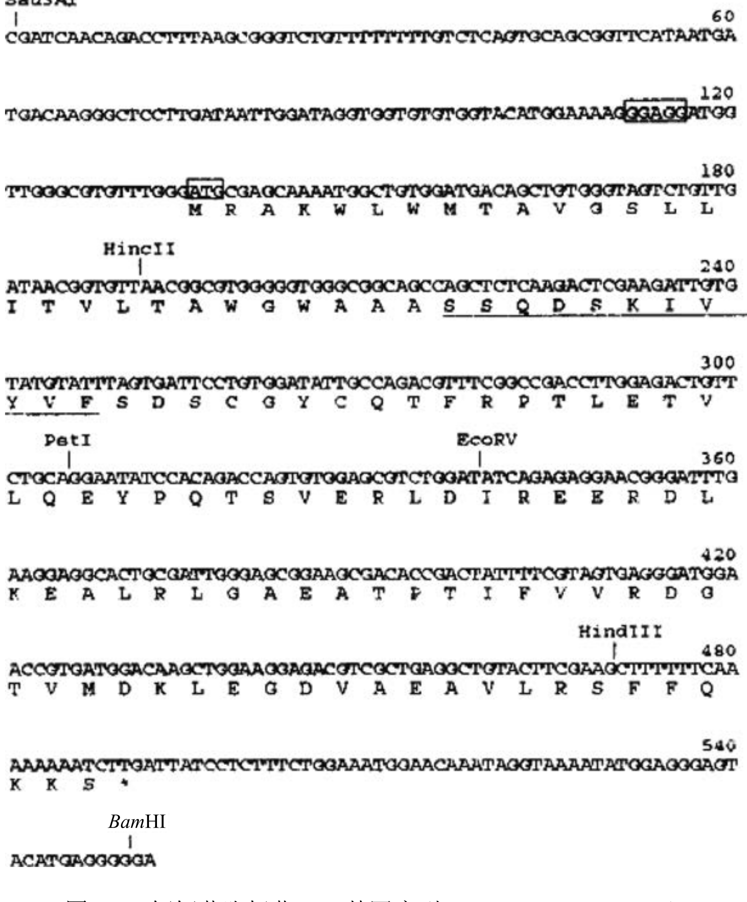


图 3-2　短短芽胞杆菌 *Bdb* 基因序列（Tatsuya *et al.*，1995）

五、短短芽胞杆菌 *aldB* 基因

aldB 基因是 α-乙酰乳酸脱羧酶基因，在啤酒发酵中发挥着重要作用，啤酒发酵中双乙酰是啤酒风味成熟的关键，双乙酰的含量过高时，会影响啤酒的风味。α-乙酰乳酸脱羧酶可将双乙酰的前体 α-乙酰乳酸快速催化降解为乙偶姻，不经过双乙酰的生成步骤，不仅可以使啤酒很快成熟，而且在很大程度上减少了啤酒中 α-乙酰乳酸的残存。酵母菌中不存在 α-乙酰乳酸脱羧酶基因，只能通过添加 α-乙酰乳酸脱羧酶制剂及采用基因工程酵母菌。

Borge 等（1990）发现一株分泌 α-乙酰乳酸脱羧酶的短短芽胞杆菌，并将 α-乙酰乳酸脱羧酶的基因 *aldB* 进行了克隆，采用双脱氧方法得到 α-乙酰乳酸脱羧酶基因 *aldB* 的序列（图 3-3），并与产气肠杆菌和枯草芽胞杆菌中的 α-乙酰乳酸脱羧酶基因 *aldB* 序列进行比对，相似性分别达 97%和 98%。α-乙酰乳酸脱羧酶基因 *aldB* 的长度为 1300bp，编码 285 个氨基酸，N 端有典型的信号肽序列，该序列中无明显的启动子类似序列，该序列的前 184bp 具有核糖体结合位点，195bp 处是起始编码区。

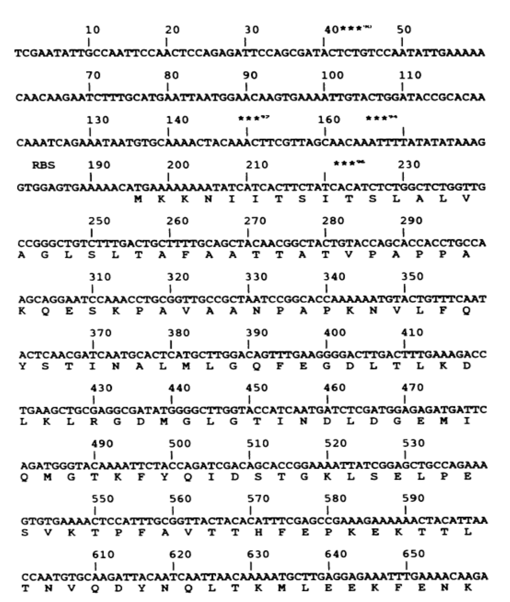
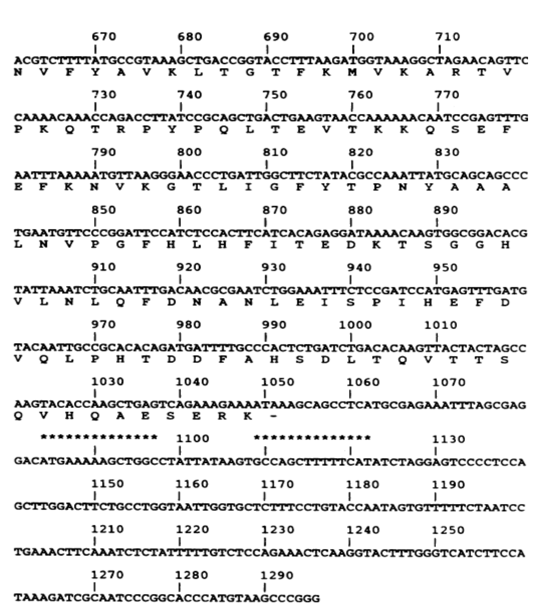



图 3-3　*aldB* 基因序列（Borge *et al.*，1990）

六、短短芽胞杆菌 *xylB* 基因

xylB 基因是耐碱性木聚糖酶基因。木聚糖酶广泛分布于细菌、真菌及藻类等微生物中，由于其来源不同，性质也有所差异。胡春霞等（2009）参照已发表的环状芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的木聚糖酶基因序列设计引物，扩增短短芽胞杆菌中的木聚糖酶基因。短短芽胞杆菌中的木聚糖酶基因序列约为 642bp，可编码 213 个氨基酸残基，前 28 个氨基酸为信号肽序列，具有典型的信号肽特性。重组到大肠杆菌中的木聚糖酶基因可顺利

表达，短短芽胞杆菌中的木聚糖酶耐高温，并且属于耐碱性的木聚糖酶。

七、短短芽胞杆菌短杆菌酪肽生物合成相关基因

目前大多研究认为，短短芽胞杆菌的抑菌机理是分泌短杆菌肽、短杆菌酪肽和几丁质酶等活性物质。短杆菌酪肽是环状的十肽抗生素，是孢子形成稳定期的产物。Mohamed 等（1987）对短短芽胞杆菌的肽类抗生素的生物合成酶基因 *tycA* 进行了研究。此酶不仅对短短芽胞杆菌具有调节作用，对枯草芽胞杆菌也具有一定的调节作用。*tycA* 基因编码短杆菌酪肽合成酶Ⅰ，*tycA* 的转录在短短芽胞杆菌的指数生长后期（即芽胞形成初期）有所降低。图 3-4 是 *tycA* 基因序列，*tycA* 与 *tycB* 同时转录，*tycB* 位于 *tycA* 基因序列的 3′端（图 3-5），*tycA* 与 *tycB* 之间存在 94bp 的间隔区，此间隔区为操纵子（Lundstrom *et al.*，1992）。短杆菌酪肽的合成至少需要 3 种多功能酶的催化，这 3 种酶分别是 TycA、TycB 和 TycC，3 种酶相互作用，以相应的氨基酸为底物合成短杆菌酪肽（图 3-6）（Gerhard *et al.*，1989；Henning and Mohamed，1997）。

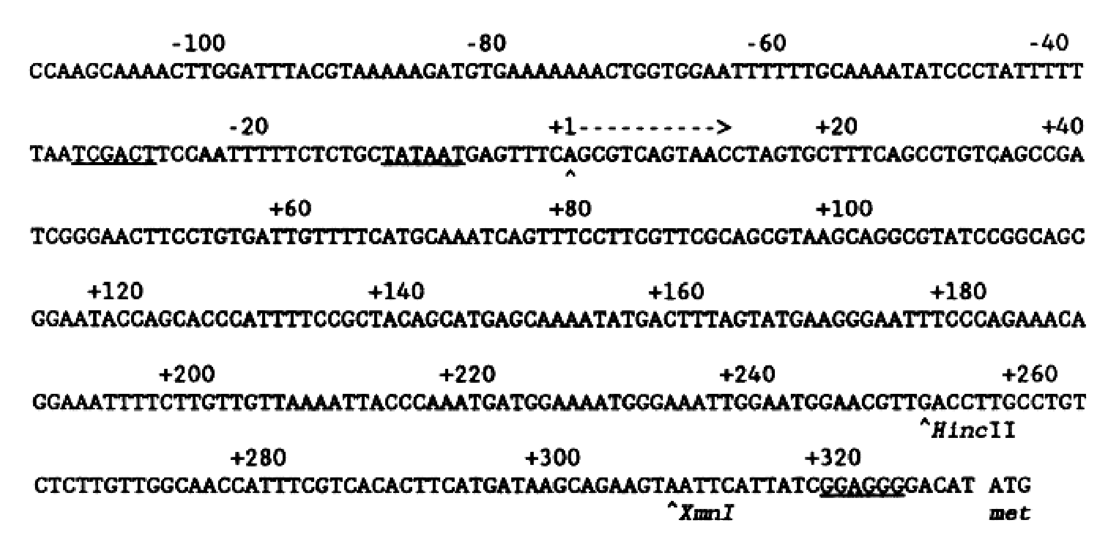


图 3-4　*tycA* 基因序列（Mohamed *et al.*，1987）

八、短短芽胞杆菌细胞壁基因

短短芽胞杆菌 47 分泌大量的胞外物质，其细胞壁具有特殊的三层结构，三层细胞壁由外至内分别被命名为外层（4.2nm）、中间层（8.5nm）和内层（2.1～3.7nm），最内层可能是肽聚糖层。不同生长阶段，细胞壁在形态学上存在一定程度的变化，在生长初期，细胞在外层细胞壁的庇护下生长，随着分泌蛋白的增加，其形态也会发生一定的变化（Hidehiko *et al.*，1981）。

```
       ---tycA◄
3381   GAG CTC GTC CTC ACA TTC TCT TAC AGC TCG GAG CAG TAT CGG
       Glu Leu Val Leu Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Glu Gln Tyr Arg
        Sst I
3423   GAA GAG TCC ATC CAG CAA TTG AGC CAA AGT TAT CAA AAG CAT
       Glu Glu Ser Ile Gln Gln Leu Ser Gln Ser Tyr Gln Lys His

3465   CTG CTT GCC ATC ATC GCG CAT TGC ACC GAG AAA AAA GAA GTA
       Leu Leu Ala Ile Ile Ala His Cys Thr Glu Lys Lys Glu Val

3507   GAG CGA ACG CCC AGC GAT TTC AGC GTC AAA GGT CTC CAA ATG
       Glu Arg Thr Pro Ser Asp Phe Ser Val Lys Gly Leu Gln MET

3549   GAA GAA ATG GAC GAT ATC TTC GAA TTG CTT GCA AAT ACA CTG
       Glu Glu MET Asp Asp Ile Phe Glu Leu Leu Ala Asn Thr Leu

3591   CGC TAA ACAGATGTTGGCCACCATTTTCAGGGGCAACTGCGTGCTTTCATTCC
       Arg ***
                                            SD              tycB◄
3644   CATTTTTATACATTTATAACAAATAAAGATATATCCGAGGTGCCGTA ATG AGT
                                                       Met Ser

3697   GTA TTT AGC AAA GAA CAA GTT CAG GAT ATG TAT GCG TTG ACC
       Val Phe Ser Lys Glu Gln Val Gln Asp MET Tyr Ala Leu Thr

3739   CCG ATG CAA GAG GGG ATG CTG TTT CAC GCC TTG CTC GAT CAA
       Pro MET Gln Glu Gly MET Leu Phe His Ala Leu Leu Asp Gln

3781   GAG CAC AAC TCG CAT CTG GTA CAG ATG TCG ATT TCG TTG CAG
       Glu His Asn Ser His Leu Val Gln MET Ser Ile Ser Leu Gln

3823   GGC GAT CTT GAC GTT GGG CTA TTT ACG GAT AGC CTG CAT GTG
       Gly Asp Leu Asp Val Gly Leu Phe Thr Asp Ser Leu His Val

3865   CTG GTA GAG AGA TAC GAT GTA TTC CGC ACG TTG TTT CTC TAT
       Leu Val Glu Arg Tyr Asp Val Phe Arg Thr Leu Phe Leu Tyr

3907   GAA AAG CCT GAA GCC AGC CCT TTG CAA GTT GTC TTG AAG CCA
       Glu Lys Pro Glu Ala Ser Pro Leu Gln Val Val Leu Lys Pro

3949   ACG CGC CTA TTC CGA TCG AAT TTT ACG CAC TTG CCC TGC CTG
       Thr Arg Leu Phe Arg Ser Asn Phe Thr His Leu Pro Cys Leu

3991   CGC ACG AGT CCG AGA AAC AAC TTC GCT ATA CGC AAT ACA AAG
       Arg Thr Ser Pro Arg Asn Asn Phe Ala Ile Arg Asn Thr Lys

4033   CGC GAT CAG GAG CGC ACG TTT CAT CTG GCA AAA GAC CCG TTG
       Arg Asp Gln Glu Arg Thr Phe His Leu Ala Lys Asp Pro Leu

4075   CAT GCC GGT GCC TTT TCC AAA TGT CCC AGC GGA CTA CAG GTC
       His Ala Gly Ala Phe Ser Lys Cys Pro Ser Gly Leu Gln Val

4117   ATC TGG AGC TTT CAT CAC ATC CTC ATG GAC GGC TGG TGC TCC
       Ile Trp Ser Phe His His Ile Leu MET Asp Gly Trp Cys Ser

4159   AGC ATT ATT TTT GAG TAC CTG CTT GCC ATC TAC TTG TCC TTG
       Ser Ile Ile Phe Glu Tyr Leu Leu Ala Ile Tyr Leu Ser Leu

4201   CAA AAG AAG ACG GCA CTC TCC CTG GAG CCC GTA CAG CCA TAC
       Gln Lys Lys Thr Ala Leu Ser Leu Glu Pro Val Gln Pro Tyr

4243   AGT CGC TTT ATC AAC TGG CTG GAA AAA CAA AAT AAA CAG GCC
       Ser Arg Phe Ile Asn Trp Leu Glu Lys Gln Asn Lys Gln Ala

4285   GCT CTC AAC TAT TGG AGC GAC TAT CTG GAA GCC TAT GAA CAA
       Ala Leu Asn Tyr Trp Ser Asp Tyr Leu Glu Ala Tyr Glu Gln

4327   AAG ACT ACC TTG CCG AAG AAG GAA GCT GCC TTC GCC AAA GCA
       Lys Thr Thr Leu Pro Lys Lys Glu Ala Ala Phe Ala Lys Ala

4369   TTT CAA CCA ACC CAA TAC CGC TTT TCG CTG AAC CGC ACC TTG
       Phe Gln Pro Thr Gln Tyr Arg Phe Ser Leu Asn Arg Thr Leu

4411   ACC AAG CAG CTC GGG
       Thr Lys Gln Leu Gly
                   Ava I
```

图 3-5　*tycA* 与 *tycB* 基因序列及之间的操纵子（Lundstrom *et al.*，1992）

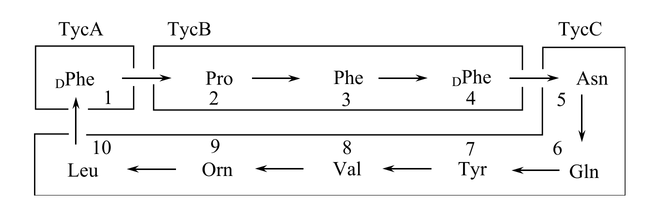


图 3-6　3 种酶在短杆菌酪肽生成中的协同作用

Hidehiko 等（1987）克隆短短芽胞杆菌 47 细胞壁蛋白基因的 5′区域，并进行了描述。该片段具有一个编码中层细胞壁的可读框，并且具有辆个翻译起始位点，每个位点都包含一个与短短芽胞杆菌 rRNA 3′端和起始密码子高度同源的序列。图 3-7 是细胞壁蛋白基因操纵子的 5′端核苷酸序列。此序列从 TTG 密码子开始编码（TTG 被认为是细菌的起始密码子），存在两个潜在的核苷酸结合位点，即为图 3-8 中的 SD1 和 SD2，从第二个

翻译起始位点开始翻译的细胞壁蛋白，具有 23 个氨基酸的典型信号肽序列，而从第一个翻译起始位点开始时，典型信号肽序列前具有 31 个电荷富集的氨基酸。Adachi 等（1990）研究发现，第一个翻译起始位点的使用频率是第二个的 1/3，因此推测第一个翻译起始位点可能是在特殊条件下发挥作用。将短短芽胞杆菌 47 的细胞壁蛋白基因操纵子 5′区域重组到大肠杆菌中，中层细胞壁蛋白可以高效表达，进一步证明了此序列是短短芽胞杆菌 47 的细胞壁蛋白基因的操纵子。

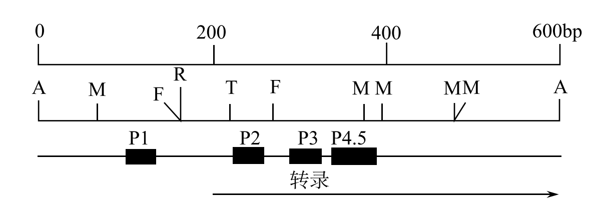


图 3-7　细胞壁蛋白基因启动子（Hidehiko *et al.*，1987）

Hidehiko 等（1987）对短短芽胞杆菌 47 的细胞壁蛋白基因进行进一步的研究，结果表明，细胞壁蛋白基因是一个由 5 个串联启动子控制的转录单元（图 3-8）。串联的启动子具有强的起始转录功能，P2 和 P3 在细胞壁蛋白分泌的过程中起主要作用，不同的是 P2 使用频率较高，P2 是细胞壁蛋白分泌的必需启动子，是分泌表达必不可少的结构，而 P3 只有细菌处在指数生长期才会被使用（Takahiro *et al.*，1989）。短短芽胞杆菌 47 独特的细胞壁结构导致其转化方法也有所不同，Takahashi 等（1983）研究了短短芽胞杆菌 47 的转化。转化方法为：Tris-PEG 转化法，并成功地将质粒 pHW1 和 pUB110 转入其细胞内，这为后期短短芽胞杆菌基因的研究奠定了基础。

九、短短芽胞杆菌 *dnaK* 基因

Hiroko 等（1998）对短短芽胞杆菌 HPD31 的 *dnaK* 基因进行了研究（GenBank 中的登录号为 AB009842）。以枯草芽胞杆菌的 *dnaK* 基因为探针，采用原位杂交的方法分离出短短芽胞杆菌中的 *dnaK* 基因，并进行了测序。核苷酸序列分析显示，该序列由 3 个可读框组成。纯化的 DnaK 蛋白显示出 ATP 酶活性，并且与谷胱甘肽 S-转移酶-DnaJ 和谷胱甘肽 S-转移酶-GrpE 协同促进蛋白质的折叠。

十、短短芽胞杆菌 *hps* 和 *phi* 基因

hps 和 *phi* 基因编码 3-己酮糖-6-磷酸合成酶和 6-磷酸-3-己酮糖异构酶（Hiroya *et al.*，2002），它们是磷酸核酮糖途径中甲醛固定所必需的。基因克隆后的序列分析显示，*hps* 和 *phi* 基因是磷酸核酮糖的操纵子。

十一、讨论

短短芽胞杆菌分布广泛，生命力强，能适应不同的生境。不同生境中的短短芽胞杆菌会呈现不同的特征，也会有不同的应用。

```
1 PvuII
CAGCTGAGAGCTATCGCTTGAAAAATTTGCGTTATGAAAATGGACTTGCGACGACTTTA

60                                                      AluI
GAGGTCATTCAATCGGAAGAAACATTGTCTACTCGTGAGAATGCGTACCAAAAAGCTATC

120
CTGTCTTACAACTTGGCTGTTGTAAACTTTGAAAATGCATTAGGAAATTAACCTAATTCA

180
AGCAAGATTATGAGGTTTTGAACCAAATTGGAAAAAGGTTCAGTCGTGACAGCCCGCCAT

240               1↓
ATGTCCCCTATAATACGGATTGTGGCGGATGTCACTTCGTACATAATGGACAGGTGAATA

300
ACGAACCACGAAAAAAACTTTAAATTTTTTTCGAAGGCGCCGCAACTTTTGATTCGCTCA

360        2↓                                          EcoRI
GGCGTTTAATAGGATGTCACACGAAAAACGGGGAATTGTGTAAAAAAGATTCACGAATTC
          FokI
420                  3↓
TAGCAGTTGTGTTACACTAGTGATTGTTGCATTTTACACAATACTGAATATACTAGAGAT

480      4↓        5↓        SD1
TTTTAACACAAAAAGCGAGGCTTTCCTGCGAAAGGAGGTGACACGCGCTTGCAGGATTCG
                                                 fMetGlnAspSer
                                                  -54
540  DraI
GGCTTTAAAAAGAAAGATAGATTAACAACAAATATTCCCCAAGAACAATTTGTTTATACT
GlyPheLysLysLysAspArgLeuThrThrAsnIleProGlnGluGlnPheValTyrThr
-50                                 -40
600  SD2                              HpaI
AGAGGAGGAGAACACAAGGTTATGAAAAAGGTCGTTAACAGTGTATTGGCTAGTGCACTC
ArgGlyGlyGluHisLysValMetLysLysValValAsnSerValLeuAlaSerAlaLeu
-30                  (fMet)         -20
660                                                     AluI
GCACTTACTGTTGCTCCAATGGCTTTCGCAGCAGAAGAAGCAGCAACTACTACAGCTCCA
AlaLeuThrValAlaProMetAlaPheAlaAlaGluGluAlaAlaThrThrThrAlaPro
-10                           ▲+1                            10
720
AAAATGGACGCTGATATGGAAAAAACCGTAAAACGTCTGGAAGCTCTTGGCCTGGTAGCA
LysMetAspAlaAspMetGluLysThrValLysArgLeuGluAlaLeuGlyLeuValAla
                              20                             30
780
GGTTATGGCAACGGCGAATACGGTGTAGACAAAACTATCACTCGTGCAGAGTTCGCTACT
GlyTyrGlyAsnGlyGluTyrGlyValAspLysThrIleThrArgAlaGluPheAlaThr
                              40                             50
840
CTGGTTGTTCGCGCTCGCGGACTGGAGCAAGGTGCGAAATTGGCACAATTCAGCAATACT
LeuValValArgAlaArgGlyLeuGluGlnGlyAlaLysLeuAlaGlnPheSerAsnThr
                              60                             70
900
TACACAGATGTGAAATCTACTGATTGGTTTGCTGGTTTCGTAAACGTAGCTTCCGGCGAA
TyrThrAspValLysSerThrAspTrpPheAlaGlyPheValAsnValAlaSerGlyGlu
                              80                             90
960
GAAATCGTAAAAGGTTTCCCGGACAAATCTTTCAAACCACAAAACCAAGTTACTTATGCT
GluIleValLysGlyPheProAspLysSerPheLysProGlnAsnGlnValThrTyrAla
                             100                            110
1020
GAAGCTGTAACTATGATCGTTCGTGCACTGGGTTATGAGCCATCCGTTAAGGGTGTATGG
GluAlaValThrMetIleValArgAlaLeuGlyTyrGluProSerValLysGlyValTrp
                             120                            130
1080
CCTAACAGCATGATCTCCAAAGCTTCCGAGCTGAACATTGCTAGAAGCATCACTACTCCT
ProAsnSerMetIleSerLysAlaSerGluLeuAsnIleAlaArgSerIleThrThrPro
                             140                            150
1140
AACAATGCAGCAACTCGTGGCGATATCTTCAAAATGCTCGACAACGCTCTTCGCGTAGAC
AsnAsnAlaAlaThrArgGlyAspIlePheLysMetLeuAspAsnAlaLeuArgValAsp
                             160                            170
1200          EcoRI
CTGATGGAGCAAGTTGAATTC
LeuMetGluGlnValGluPhe
```

图 3-8　短短芽胞杆菌 47 细胞壁蛋白基因 5′区域（Hidehiko *et al.*，1981）

1. 作为分泌表达外源蛋白的宿主

蛋白质的分泌表达是细胞普遍存在的蛋白质表达方式，分泌表达的蛋白质具有如下优点：可溶性，正确折叠，有生物活性，易获得，无需破碎细胞，仅利用简单的纯化手段即可获得。目前常用的原核分泌表达系统还存在不足，如大肠杆菌作为分泌表达外源蛋白受体时，容易形成包涵体，产物分泌表达水平低，而且经常分泌至周质空间而非胞外（Baneyx，1999）。枯草芽胞杆菌分泌性强且无致病性，但胞外的蛋白酶活性高，容易引起产物的降解（Sarvas，1995）。短短芽胞杆菌具有分泌蛋白能力强和胞外蛋白酶活性低等特点（Udaka *et al.*，1989；Udaka and Yamagata，1993），因此短短芽胞杆菌是比较理想的外源蛋白表达宿主。Yamagata 等（1989）和 Takagi 等（1989）已经将短短芽胞杆菌作为外源蛋白表达宿主，成功表达了人类表皮生长因子和喜温植物的α-淀粉酶。

Jong 等（2010）为研究短短芽胞杆菌的杀虫活性，特将苏云金芽胞杆菌的灭蚊晶体蛋白基因重组到短短芽胞杆菌中，携带 *cry11Aa* 基因的苏云金芽胞杆菌表达载体，在 *cryAc* 启动子的介导下转入短短芽胞杆菌，重组的短短芽胞杆菌成功表达 Cry11A 蛋白，转化菌株对两类双翅目的幼虫具有杀虫活性。Masahiro 等（1996）也利用短短芽胞杆菌作为表达受体，将产气夹膜杆菌的α-毒素基因克隆出来，构建分泌表达载体，转入到短短芽胞杆菌 47 中，重组的短短芽胞杆菌成功表达 α-毒素蛋白，并且其产量是枯草芽胞杆菌的 10 倍。Satoshi 等（2000）将编码成熟大肠杆菌热稳定的肠毒素 B 亚基的基因克隆出来，并插入 pNU212 载体中，将重组载体介导转入短短芽胞杆菌中，此基因在短短芽胞杆菌 HPD31 中高效表达。

2. 短短芽胞杆菌在生物防治中的应用

Edwards 和 Seddon（2001）报道，短短芽胞杆菌对大白菜的灰霉病菌具有防治作用，在短短芽胞杆菌或短杆菌肽 S 存在时，能够有效抑制灰霉病菌的生长。Vivas 等（2006）利用菌株之间的相互作用，对短短芽胞杆菌进行了研究，当短短芽胞杆菌与菌根菌共同存在时，可以抑制植物对重金属的吸收，促进植物生长。易有金等（2007）从烟草茎秆中分离到内生细菌——短短芽胞杆菌，发现其对由青枯雷尔氏菌引起的烟草青枯病具有一定的防效。

郝晓娟等（2007）利用短短芽胞杆菌 JK-2 防治番茄枯萎病，对番茄枯萎病的盆栽防效和田间防效分别为 83.82%和 74.7%。短短芽胞杆菌 JK-2 的滤液能抑制枯萎病菌的菌丝生长，对病原菌孢子的萌发也具有明显的抑制作用，同时，还可引起菌丝的消解、产生泡状物、破坏生长点、引起细胞内含物外溢等。

短短芽胞杆菌 A57，是新疆农业科学院自棉花根际土壤中分离得到的，陈莉等（2008）对其在防治棉花立枯病、枯萎病等病原真菌引起的植物病害方面进行了研究，短短芽胞杆菌 A57 对棉花的立枯病、枯萎病等病原真菌具有明显的抑制作用。短短芽胞杆菌 A57 可影响枯萎病菌的菌丝生长，致使其菌丝体扭曲、断裂、出现畸形泡状物和原生质泄漏，对分生孢子的生长也有一定的影响，短短芽胞杆菌 A57 附近的分生孢子表现出畸形，并且芽管萌发处有泡状物。

3. 有机污染物的微生物降解

微生物采油为采油技术的发展提供了新方向，微生物采油不仅降低采油成本，而且无污染，越来越受到重视。郭万奎等（2007）根据大庆油田的环境，筛选出能够降解高碳链饱和烃的短短芽胞杆菌，并且在大庆外围特低渗透油田开展的微生物试验取得了理想效果。在污染区可分离到具有降解污染物能力的短短芽胞杆菌。Archna 等（2000）对短短芽胞杆菌和环状芽胞杆菌降解六氯环己烷方面进行了研究，分离自六氯环己烷污染土壤的短短芽胞杆菌和环状芽胞杆菌，可以分解六氯环己烷的 α、γ、β 和 δ 异构体。短短芽胞杆菌也具有降解苯酚的能力，Arutchelvan 等（2006）对短短芽胞杆菌降解高浓度苯酚的动力学进行了研究。

4. 其他方面的应用

Uttam 等（1999）对兼性厌氧的嗜热和嗜温的短短芽胞杆菌中的碱性蛋白酶进行了研究。摇瓶培养获得的碱性蛋白酶在 pH10.5 和 37℃具有最大活性。碱性蛋白酶是胞外蛋白，具有热稳定性，并且可以和多数清洁剂兼容，这些特征显示其适合作为洗涤剂助推剂。短短芽胞杆菌分泌的碱性蛋白酶，可促进各种洗涤剂的清洁功能的发挥。Marina 等（2007）的研究结果表明，短短芽胞杆菌分泌的短杆菌酪肽可抑制疟原虫的发展和生命循环的进行。

短短芽胞杆菌的抗菌谱广、对人畜安全、对环境无污染及促进植物生长等优点，符合绿色、可持续的农业发展需求，为其广泛应用提供方便。目前多数研究认为，短短芽胞杆菌主要通过分泌短杆菌酪肽和短杆菌肽抑制微生物的生长代谢。虽然短短芽胞杆菌在生物防治上应用较多，在国内外均有报道，但其抑菌机制还不清楚。目前国内短短芽胞杆菌的研究还停留在分离筛选及其抑菌活性的测定上，对于短短芽胞杆菌基因功能的研究目前还停留于克隆表达的层面，随着分子生物学的迅速发展，其基因功能和抑菌机制必将为人类所了解。

第四节　苏云金芽胞杆菌 *cry1Ac* 基因克隆

一、概述

苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*，Bt）是一种自然界中广泛分布的革兰氏阳性菌，从昆虫、土壤、储藏品及尘埃、污水和植被等来源上均已分离到，据估计全世界已分离保存的 Bt 菌株有 60 000 多个，其杀虫晶体蛋白是单基因直接表达的产物，不同基因型所表达的产物具有显著不同的杀虫特异性。1981 年，Schnepf 和 Whiteley 克隆了苏云金芽胞杆菌的第一个杀虫晶体蛋白基因，并于 1985 年发表了它的 DNA 碱基序列及其编码蛋白质的氨基酸序列。至 2006 年，已有 325 种杀虫晶体蛋白基因得以克隆并测序，这些基因及其蛋白质的分类经历了一个演替过程。1993 年，Lereclus 等将苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 图谱分为 5 类：第一类含 CryⅠ和 CryⅡ，分子质量为 130～

140kDa 和 67kDa；第二类仅含 CryⅠ，分子质量为 130～140kDa；第三类仅含 CryⅢ，分子质量约为 67kDa；第四类则为 CryⅣ，分子质量为 130kDa、67kDa 和 27kDa；第五类则仅含分子质量为 40～45kDa 的杀虫晶体蛋白，各类都表现出不同的杀虫活性谱。1998 年，Crickmore 等依据氨基酸序列同源性建立了新的 Bt 杀虫蛋白基因命名系统，将其分为 *cry* 和 *cyt* 两大类，其中 *cry1* 和 *cry2* 对鳞翅目有毒性；*cry3*、*cry7* 和 *cry8* 对鞘翅目有活性；*cry4*、*cryl0* 和 *cyt* 对双翅目有活性；*cry5*、*cryl2*、*cryl3* 和 *cryl4* 有杀线虫的活性。根据 Bt 的基因型，就可预测其杀虫活性。因此，杀虫晶体蛋白基因型的鉴定，对于菌株鉴定及筛选、杀虫特性的了解、杀虫谱的改良等工作均有重要意义。而聚合酶链反应（PCR）作为一种检测目标 DNA 序列最为快速和有效的方法，已经被许多学者用于鉴定苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的基因组成和预测它们的杀虫活性。用于鉴定苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因型的聚合酶链反应主要有：特异复合 PCR 鉴定、共同复合 PCR 鉴定、两次复合 PCR 鉴定、特异 PCR 鉴定和 PCR-RFLP 鉴定。以色列 Ben-Gurion 大学生命科学系 Ben-Dov（1997）运用两次复合 PCR，快速鉴定对鳞翅目、鞘翅目、双翅目害虫有效的杀虫晶体蛋白基因，设计的 5 对通用引物，可扩增出 20 种 *cryl*、3 种 *cry2*、4 种 *cry3*、2 种 *cry4*、2 种 *cry7* 和 3 种 *cry8* 基因型的相应区段，得到基因型的大类分布，再辅以更细致的特异引物进行二次扩增分析，鉴定出具体的基因型。

苏云金芽胞杆菌菌株 LSZ-9408 是福建省农业科学院农业生物资源研究所分离的对多种害虫具有高毒力的苏云金芽胞杆菌，对杀虫蛋白晶体的 SDS-PAGE 分析表明其含有 130kDa 和 65kDa 的毒性多肽。在此基础上，研究拟进一步确定其 *cry* 基因型并克隆相关毒素基因。拟采用的方案为：使用通用引物 PCR 法判定出所含 *cry* 基因所属的大类；通过扩增产物的序列测定并提交 GenBank 进行 Blast 比较，寻找同源性最高的 *cry* 基因序列，推定基因的确定类型；对检测到的每个基因，依其同源序列设计引物，扩增全长序列，连接到测序载体中，转化大肠杆菌后测定其序列，从而明确该菌株的 *cry* 基因型，为该菌株毒蛋白的进一步研究应用建立基础。

二、研究方法

苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株的 *cry* 基因型的鉴定：PCR 鉴定通用引物，参照 Bravo 等（2002）文献，选择 5 对通用引物用于判定苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408），菌株的 *cry* 基因类型、引物序列、预计片段长度及退火温度详见表 3-1。

表 3-1　鉴定 Bt 基因型所用通用引物的特征

引物	识别基因	靶标生物	引物序列	产物大小/bp	退火温度/℃
Un1	*cry1*	鳞翅目	（d）5′-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3′	274～277	58
			（r）5′-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3′		
Un2	*cry2*	鳞/双翅目	（d）5′-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3′	689～701	55
			（r）5′-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3′		
Un3	*cry3*	鞘翅目	（d）5′-CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC-3′	589～604	58
			（r）5′-CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT-3′		

续表

引物	识别基因	靶标生物	引物序列	产物大小/bp	退火温度/℃
Un4	*cry4*	双翅目	（d）5′-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3′	439	60
			（r）5′-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC-3′		
Un7、Un8	*cry7*、*cry8*	双翅目	（d）5′-AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC-3′	420～423	54
			（r）5′-CTTCTAAACCTTGACTACTT-3′		

PCR 反应体系：10×Buffer 2.5μl，2.5mmol/L dNTP 2μl，上游引物和下游引物各 1μl，模板为苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株平板菌落（培养时间 36h），*Taq* 酶 0.25μl，PCR 反应体积 25μl。PCR 反应程序：94℃预变性 10min（8min 时加 *Taq* 酶），94℃变性 30s，退火 60s，各引物所使用的退火温度设置见表 3-1，72℃延伸 60s，30 个循环，72℃再延伸 10min。PCR 反应是在全自动 PCR 扩增仪上进行。取 PCR 产物 5μl 在浓度为 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳（100V 电压下电泳 40min），荧光染料染色，可见光激发观察。对苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株 *cry1* 基因片段测序分析，扩增 *cry1* 片段，选择条带单一明亮的 PCR 扩增产物委托上海生工进行测序，采用 PCR 产物直接测序法，双向测序。使用 ContigExpress 软件对公司返回的正向和反向序列的测序图谱进行拼接，获得的片段序列在 GenBank 上进行 Blast 比对，寻找相似度最高的基因序列，分析所得片段序列所属的 *cry* 基因类别。

大肠杆菌 DH5α 感受态细胞制备方法：①挑取 DH5α 菌斑接种于 8ml LB 中，37℃过夜摇菌 12h；②取 400μl 菌液加入 40ml（即 1∶50～1∶100）LB 中，培养 1～3h，注意观察，当出现云雾状即可；③加入 50ml 离心管，冰上放置 30min（分装前，摇匀菌体）；④4000r/min 离心 15min，4℃，弃上清，倒置于灭菌吸水纸上 1min；加入预冷的 22ml 0.1mol/L $CaCl_2$（新鲜配制，121℃ 20min 高压蒸汽灭菌），吹吸混匀（轻轻吹吸，将沉淀悬起即可），合并至一管，冰浴 30min；⑤4000r/min × 5min（低速避免细胞受损），弃上清，倒置 1min，加入 2.666ml 的 0.1mol/L $CaCl_2$·DMSO（7%的 DMSO）溶液，即 2.47ml $CaCl_2$+187μl DMSO（4℃预冷）；⑥冰上放置 20min，分装至 1.5ml 离心管中，每管 100μl；⑦液氮速冻后−70℃保存。

苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株 *cry2* 基因片段扩增：*cry2* 扩增片段无法使用 PCR 产物直接测序法，扩增后需连接到克隆载体上进行测序。PCR 扩增的反应体系：10×Buffer 2.5μl，2.5mmol/L dNTP 2μl，上游引物和下游引物各 1μl，模板，*Taq* 酶 0.13μl，PCR 反应体积 25μl。PCR 反应程序：94℃预变性 5min，94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 60s，30 个循环，72℃再延伸 10min。

扩增产物纯化与连接：使用 BioFlux 胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物，纯化产物使用 Takara 公司的连接试剂盒克隆到测序载体 pMD18-T Vector 中。

连接产物转化感受态细胞：全量（10μl）的连接产物加入到 100μl 的感受态细胞菌液中，混匀后，冰上放置 30min，42℃水浴锅热激 90s，在冰上放置 3min，加入 800μl 的 LB 培养基（不含 AMP），37℃、150r/min 振荡 60min，室温下 4000r/min 离心 3min，加入 4μl 200mg/ml IPTG 和 40μl 20mg/ml X-gal，混匀后涂布于含 50μg/ml 的 AMP+ LB

平板上，37℃过夜培养 12～24h，正常情况下，白斑大多为目的片段克隆菌落，蓝斑为空载体自连菌落。

测序、拼接与分析：挑取克隆菌落分别使用目的片段引物和 M13 引物进行 PCR 检测，挑取阳性克隆测序，并将测序结果进行拼接和比对。

苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）*cry1Ac* 全长基因的 PCR 扩增，根据所得 *cry1* 片段序列信息，登录 NCBI 下载 *cry1Ac* 序列；根据文献合成引物，预计扩增片段长度为 3.6kb，上游引物 5′-TTATGGATAACAATCCGAACA-3′，下游引物 5′-GACTATTCCTCCATAAGGAGTAA-3′，使用 Ex *Taq* 酶，扩增体系为：Buffer 2.50μl，2.5mmol/L dNTP 2μl，上游引物 1.00μl，下游引物 1.00μl，模板 1.00μl，Ex *Taq* 酶 0.13μl，dd H_2O 17.37μl，总体系 25.00μl。扩增程序为：94℃ 10min，94℃ 30s，49.3℃ 90s，72℃ 6min 循环 35 次，最后 72℃ 10min。扩增产物在 120V 电压下电泳 30min 观察结果。电泳琼脂糖浓度 1.0%，荧光染料染色，可见光激发观察。PCR 产物使用 BioFlux 胶回收试剂盒回收，连接到测序载体 pMD18-T，转化大肠杆菌，使用 Ex *Taq* 酶扩增引物和 M13 引物检测阳性克隆，采用 M13 引物体系，只是更换了引物，扩增程序中退火温度修改为 53℃，其余相同。阳性克隆送上海生工测序，使用 Contig 软件拼接全长序列，用 DNAStar 软件分析。

苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株 *cry2Ab* 基因克隆与测序：*cry2Ab* 全长基因的 PCR 扩增，采用 Ex *Taq* 酶，根据同源序列信息，设计引物，上游引物 5′-ATGAATAGTGTATTGAATAGC -3′，下游引物 5′- AAACTTTAATAAAGTGGTG -3′，预计扩增片段长度为 2kb。扩增体系为：Buffer 2.50μl，2.5mmol/L dNTP 2.0μl，上游引物 1.00μl，下游引物 1.00μl，模板 1.00μl，*Taq* 酶 0.2μl，dd H_2O 17.3μl，总体系 25.00μl。扩增程序为：94℃ 5 min，94℃ 45s，梯度（44.7℃/45.6℃/46.6℃/47.5℃/48.5℃/49.4℃/50.4℃/51.2℃/52.0℃）各 45s，72℃ 2.5min 循环 35 次，最后 72℃ 10min。扩增产物在 120V 电压下电泳 30min 观察结果。电泳琼脂糖浓度 1.0 %，荧光染料染色，可见光激发观察。

三、*cry* 基因型的鉴定

1. PCR 扩增与检测

PCR 扩增检测结果见图 3-9，使用 Un1 和 Un2 引物分别扩增得大小约为 270bp 和 700bp 的条带，与预计产物大小相符。Un3、Un4、Un7、Un8 引物扩增无条带，初步结果显示，在苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）中含有两种 *cry* 基因，分别属于 *cry1* 和 *cry2* 大类。

2. 苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株 *cry1* 基因片段测序分析

使用 ContigExpress 软件对 *cry1* 基因片段的正向和反向序列的峰图进行对比拼接，获得的片段序列如下。将拼接后的扩增片段序列提交到 NCBI 进行 Blast 比对，与很多全长序列中的片段序列呈现高度的吻合性，相似度排在最前面的都是 *cry1Ac* 基因序列，相似度在 98%以上，初步判定该基因为 *cry1Ac*。序列如下。

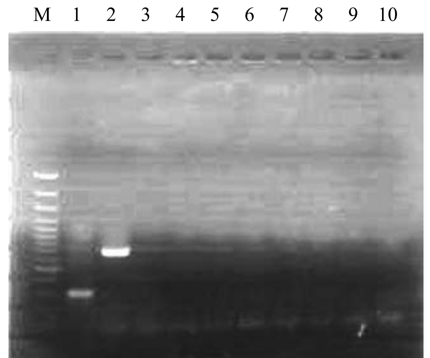


图 3-9　苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株 *cry* 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

试样 M 到 10 分别为：Marker、Un1、Un2、Un3、Un4、Un7、Un8、CK1、CK2、CK3、CK4、CK7、CK8；1 约 270bp，2 约 700bp

```
1   CGTCGGCAGA TAAACGTGTT CATAGCATTS GRGWAGCTTA TCWGCCTGAG CTGTCTGTGA
61  TTCCGGGTGT CAATGCGGCT ATTTTTGAAG AATTAGAAGG GCGTATTTTC ACTGCATTCT
121 CCCTATATGA TGCGAGAAAT GTCATTAAAA ATGGTGATTT TAATAATGGC TTATCCTGCT
181 GGAACGTGAA AGGGCATGTA GATGTAGAAG AACAAAACAA CCAACGTTCG GTCCTTGTTG
241 TTCCGGAATG GGAAGCAGAG TGTCACAAA
```

3. 苏云金芽胞杆菌（Bt LSZ-9408）菌株 *cry2* 基因片段克隆测序与分析

调整PCR扩增条件后得到了较好的扩增效果，见图3-10，纯化后检测结果见图3-11。转化后的平板菌落经培养得到 17 个单菌落。以菌落为模板，分别使用 Un2 引物进行阳性克隆 PCR 扩增检测，结果见图 3-12　。取 3 号和 14 号菌落振荡液体培养，取菌液 PCR 检测（M13 引物），检测结果见图 3-13。

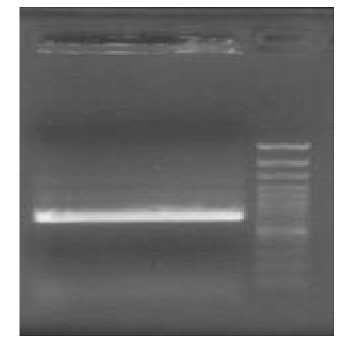


图 3-10　扩增产物（纯化前）电泳图

从左到右为扩增产物、Marker

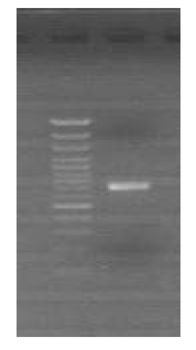


图 3-11　扩增产物（纯化后）电泳图

从左到右为 Marker、纯化后扩增产物

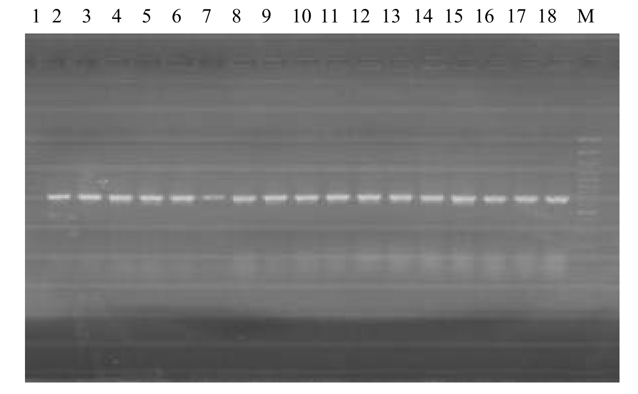


图 3-12　Un2 引物检测电泳图

从左至右依次为空白、1～17 号、Marker

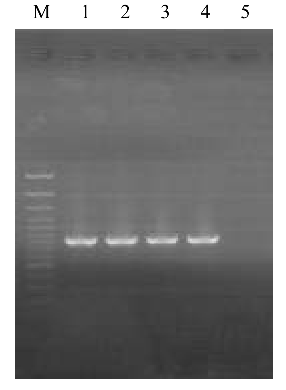


图 3-13　M13 引物检测电泳图

从左至右依次 Marker、3 号、3 号、14 号、14 号、空白

根据上海生工返回的 ABL 数据，得到 651bp 长的片段序列。序列如下。

```
1   GTATTTCAGC AGCAACATTA CGTACGTATC GAGATTACCT GAGAAATTAT ACAAGAGATT
61  ATTCTAATTA TTGTATAAAT ACGTATCAAA CTGCGTTTAG AGGGTTAAAC ACCCGTTTAC
121 ACGATATGTT AGAATTTAGA ACATATATGT TTTTAAATGT ATTTGAATAT GTATCCATTT
181 GGTCATTGTT TAAATATCAG AGTCTTATGG TATCTTCTGG CGCTAATTTA TATGCAAGTG
241 GTAGTGGACC ACAGCAGACC CAATCATTTA CTTCACAAGA CTGGCCATTT TTATATTCTC
301 TTTTCCAAGT TAATTCAAAT TATGTGTTAA ATGGATTTAG TGGTGCTAGG CTTTCTAATA
361 CCTTCCCTAA TATAGTTGGT TTACCTGGTT CTACTACAAC TCACGCATTG CTTGCTGCAA
421 GGGTTAATTA CAGTGGAGGA ATTTCGTCTG GTGATATAGG TGCATCTCCG TTTAATCAAA
481 ATTTTAATTG TAGCACATTT CTCCCCCCAT TGTTAACGCC ATTTGTTAGG AGTTGGCTAG
541 ATTCAGGTTC AGATCGGGAG GGCGTTGCCA CCGTTACAAA TTGGCAAACA GAATCCTTTG
601 AGACAACTTT AGGGTTAAGG AGTGGTGCTT TTACAGCTCG CGGTAATTCA A
```

NCBI 比对结果中匹配度最高的 3 条序列见表 3-2，初步结果表明该菌株中含有 *cry2Ab* 基因。

表 3-2　匹配度最高的 3 条序列

基因序号	标题	相似度/%
EF157308.1	*B. thuringiensis* strain lyL *cry2Ab*-type insecticidal crystal protein gene，complete cds	97
AF441855.1	*B. thuringiensis* ly30 *cry2Ab* （*cry2Ab*） gene，complete cds	97
AY297091.1	*B. thuringiensis* plasmid-encoded crystal delta-endotoxin *cry2Ab*-HB （*cry2Ab*） gene，complete cds	97

四、*cry1Ac*基因克隆与测序

1. *cry1Ac* 全长基因的 PCR 扩增

电泳检测结果见图 3-14～图 3-16，Ex *Taq* 酶在 49.3℃退火温度时能顺利扩增出全长片段。

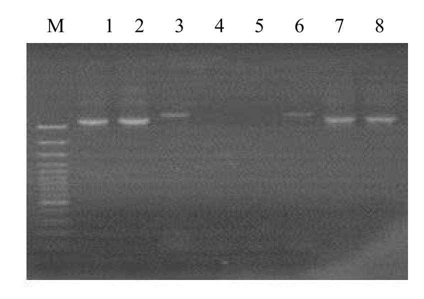


图 3-14　Ex *Taq* 扩增结果

M 为 Marker；1～2 为 Ex *Taq* 49.3℃，大于 3000bp；7～8 为普通 *Taq* 49.3℃，大于 3000bp

图 3-15　胶回收结果

M 为 Marker；
1 为回收产物

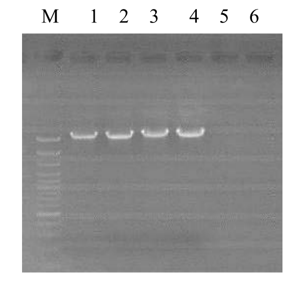


图 3-16　Ex *Taq* 检测扩增结果

M 为 Marker；1～2 为 Ex *Taq* +扩增引物 49.2℃，3～4 为 Ex *Taq* + M13 54.0℃，5～6 为对照

2. *cry1Ac* 基因克隆

取 PCR 扩增产物 100μl 回收后产物 2μl 进行电泳检测。换算出目的片段的物质的量浓度约为 0.024pmol/L，浓度较低。为尽可能提高连接效率，加大了体系中的目的片段体积，延长了连接反应时间。使用 Takara 试剂盒，连接体系为 pMD18-T 1.0μl，目的片段 4.0μl，Solution Ⅰ 5.0μl，总体系 10μl，16℃反应 8h。连接反应结束后转化至大肠杆菌中，平板置 36.7℃培养约 36h，得到一个白色菌落，挑取菌落过夜培养，使用扩增引物和 M13 引物检测克隆子中是否含有全长片段。检测结果见图 3-16，表明克隆转化成功，送上海生工测序。

3. *cry1Ac* 基因测序与分析

全长测序所得序列中的 ORF 为 3537bp，编码 1178 个氨基酸，暂定名为 *cry1Ac*-LSZ-9408，将 ORF 序列提交到 NCBI 进行 Blast 比对，同源性居前的均为 *cry1Ac*。相似度最高的前 3 条序列分别为 AJ002514.1，*B. thuringiensis kurstaki cry2*18 gene，相似度 99%；AY225453.1，*B. thuringiensis Cry1Ac*（*cry1Ac*）gene，complete cds，相似度 99%；U89872.1，*B. thuringiensis Cry1Ac* delta-endotoxin gene，complete cds，相似度 99%。该序列已提交 GenBank，登录号 EU623975。推定此 ORF 翻译蛋白质长度为 1178 个氨基酸，分子质量 133.4kDa，等电点 4.94。序列如下：

```
1   MDNNPNINEC IPYNCLSNPE VEVLGGERIE TGYTPIDISL SLTQFLLSEF VPGAGFVLGL
61  VDIIWGIFGP SQWDAFLVQI EQLINQRIEE FARNQAISRL EGLSNLYQIY AESFREWEAD
121 PTNPALREEM RIQFNDMNSA LTTAIPLFAV QNYQVPLLSA YVQAANLHLS VLRDVSVFGQ
```

```
181 RWGFDAATIN SRYNDLTRLI GNYTDYAVRW YNTGLERVRG PDSRDWVRYN QFRRELTLTV
241 LDIVALFPNY DSRRYPIRTV SQLTREIYTN PVLENFDGSF RGSAQGIERS IRSPHLMDIL
301 NSITIYTDAH RGYYYWSGHQ IMASPVGFSG PEFTFPLYGT MGNATPQQRI VAQLGQGVYR
361 TLSSTLYRRP FNIGINNQQL SVLDGTEFAY GTSPNLPSAV YRKSGTVDSL DEIPPQNNNV
421 PPRQGFSHRL SHVSMFRSGF SNSSVSIIRA PMFSWIHRSA EFNNIIASDS ITQIPAVKGN
481 FLFNGSVISG PGFTGGDLVR LNSSGNNIQS RGYIEVPIHF PSTSTRYRVR VRYASVTPIH
541 LNVNWGNSSI FSNTVPATAT SLDNLQSSDF GYFESANAFT SSLGNIVGVR NFSGTAGVII
601 DRFEFIPVTA TLEAEYNLER AQKAVNALFT STNQLGLKTN VTDYHIDQVS NLVTYLSDEF
661 CLDEKRELSE KVKHAKRLSD ERNLLQDSNF KDINRQPERG WGGSTGITIQ GGDDVFKENY
721 VTLSGTFDEC YPTYLYQKID ESKLKAFTRY QLRGYIEDSQ DLEIYLIRYN AKHETVNVPG
781 TGSLWPLSAQ spIGKCGEPN RCAPHLEWNP DLDCSCRDGE KCAHHSHHFS LDIDVGCTDL
841 NEDLGVWVIF KIKTQDGHAR LGNLEFLEEK PLVEEALARV KRAEKKWRDK REKLEWETNI
901 VYKEAKESVD ALFVNSQYDQ LQADTNIAMI HAADKRVHSI REAYLPELSV IPGVNAAIFE
961 ELEGRIFTAF SLYDARNVIK NGDFNNGLSC WNVKGHVDVE EQNNQRSVLV VPEWEAEVSQ
1021 EVRVCPGRGY ILRVTAYKEG YGEGCVTIHE IENDTDELKF SNCVEEEIYP NNTVTCNDYT
1081 VNQEEYGGAY TSRNRGYNEA PSVPADYASV YEEKSYTDGR RENPCEFNRG YRDYTPLPVG
1141 YVTKELEYFP ETDKVWIEIG ETEGTFIVDS VELLLMEE
```

五、*cry2Ab* 基因克隆与测序

1. *cry2Ab* 的 PCR 扩增

退火温度筛选结果见图 3-17，使用的退火温度均能顺利扩增，选择 49℃为退火温度。

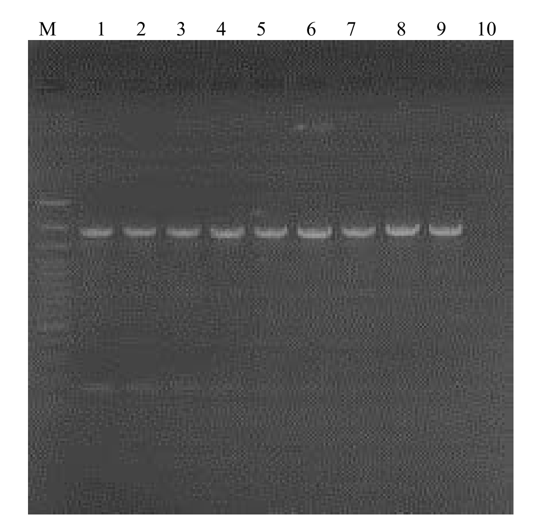


图 3-17　退火温度筛选扩增结果

M 为 Marker，1～9 退火温度依次为：44.7℃、45.6℃、46.6℃、47.5℃、48.5℃、49.4℃、50.4℃、51.2℃、52.0℃；10 为空白

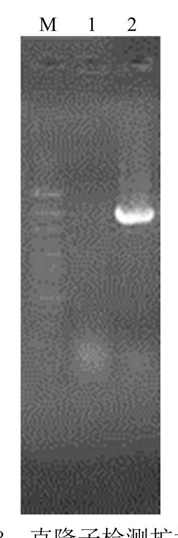


图 3-18　克隆子检测扩增结果

M 为 Marker；1 为空白；2 为菌落

2. *cry2Ab* 基因克隆

使用 Takara 试剂盒，连接体系为 pMD18-T 1.0μl，目的片段 4.0μl，Solution Ⅰ 5.0μl，总体系 10μl，16℃反应 8h。连接反应结束后转化至大肠杆菌中，平板置 36.7℃培养箱

培养约 18h，得到若干白色菌落，M13 引物检测结果见图 3-18，表明克隆转化成功，送上海生工测序。

3. *cry2Ab* 基因测序与分析

全长测序所得序列中的可读框，长度为 1902bp，翻译 633 个氨基酸，暂定名为 *cry2Ab*-LSZ-9408，将 ORF 序列提交到 NCBI 进行 Blast 比对，同源性居前的均为 *cry2Ab*。相似度最高的前 3 条序列分别为：X55416.1，*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 plasmid gene for crystal protein CryIIB，相似度 99%；AF164666 *B. thuringiensis* plasmid *Cry2Ab*（*cry2Ab*） gene，complete cds，相似度 99%；M23724.1 *B. thuringiensis* insecticidal crystal protein （cryB2） gene，complete cds，相似度 99%。该序列已提交 GenBank，登录号 EU623976。推定此 ORF 翻译蛋白质长度为 633 个氨基酸，分子质量为 70.694kDa，等电点 8.815。NCBI 的 Blast 结果表明与相似度最高的 P21254 相似度为 99%，有两个残基不同。序列如下。

```
1   MNSVLNSGRT TICDAYNVAA HDPFSFQHKS LDTVQKEWTE WKKNNHSLYL DPIVGTVASF
61  LLKKVGSLVG KRILSELRNL IFPSGSTNLM QDILRETEKF LNQRLNTDTL ARVNAELTGL
121 QANVEEFNRQ VDNFLNPNRN AVPLSITSSV NTMQQLFLNR LPQFQMQGYQ LLLLPLFAQA
181 ANLHLSFIRD VILNADEWGI SAATLRTYRD YLKNYTRDYS NYCINTYQSA FKGLNTRLHD
241 MLEFRTYMFL NVFEYVSIWS LFKYQSLLVS SGANLYASGS GPQQTQSFTS QDWPFLYSLF
301 QVNSNYVLNG FSGARLSNTF PNIVGLPGST TTHALLAARV NYSGGISSGD IGASPFNQNF
361 NCSTFLPPLL TPFVRSWLDS GSDREGVATV TNWQTGSFET TLGLRSGAFT ARGNSNYFPD
421 YFIRNISGVP LVVRNEDLRR PLHYNEIRNI ASPSGTPGGA RAYMVSVYNR KNNIHAVHEN
481 GSMIHLAPND YTGFTISPIH ATQVNNQTRT FISEKFGNQG DSLRFEQNNT TARYTLRGNG
541 NSYNLYLRVS SIGNSTIRVT INGRVYTATN VNTTTNNDGV NDNGARFSDI NIGNVVASSN
601 SDVPLDINVT LNSGTQFDLM NIMLVPTNIS PLY
```

六、讨论

研究采用通用鉴定引物 PCR 扩增结合原先的晶体蛋白电泳结果，判定苏云金芽胞杆菌 LSZ-9408 的 *cry* 基因分属 *cry1* 和 *cry2* 两大类，PCR 扩增片段的序列在 GenBank 上的比对结果表明其分别属于 *cry1Ac* 和 *cry2Ab*。在此基础上，根据同源序列设计引物克隆了这两个基因，并对其全长序列进行了测定分析，菌株登录号分别为EU623975和EU623976。

研究结果表明苏云金芽胞杆菌 LSZ-9408 菌株中含有 *cry1Ac* 和 *cry2Ab* 基因，对应的杀虫晶体蛋白为 CryI 和 CryII，分子质量分别为 133.4kDa 和 70.694kDa，印证了晶体蛋白的 SDS-PAGE 结果。这两类蛋白质对鳞翅目害虫具有很强的毒杀作用，但作用机理不尽相同，该菌株很有可能被用来延缓或阻止鳞翅目害虫对 Bt 单一杀虫晶体蛋白基因制剂的抗性发展，这有待进一步研究。

研究结果还表明，PCR 技术是一种检测、鉴定 Bt 杀虫晶体蛋白基因的快速、准确而简便的方法。把 PCR 和 SDS-PAGE 分析结合起来，既能检测待鉴定基因种类，又能确定基因是否表达，初步给出了 Bt 的基因组成和蛋白质组成，为解决害虫对 Bt 的抗性

提供研究基础。

第五节　短短芽胞杆菌几丁质酶基因克隆

一、概述

几丁质是由 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖以 β-1,4-糖苷键连接而成的线性高分子聚合物（Han *et al.*，2009），广泛存在于甲壳类生物、昆虫的外壳及真菌的细胞壁中（Jankiewicz *et al.*，2012）。几丁质酶是一种能够降解几丁质的内切酶，是糖苷水解酶 18 家族和 19 家族的成员，具有一系列复杂的结构和作用机制（Busby *et al.*，2012）。近几十年来，在虾、蟹、草履虫、细菌及植物等许多生物中都发现了几丁质酶的存在（叶辉等，2008），大多数植物和放线菌属几丁质酶属于 19 家族，而真菌几丁质酶属于 18 家族（Lim and Choi，2010）。某些细菌通过几丁质酶分解几丁质获得碳源和能源（Cohen-Kupiec and Chet，1998），植物抗真菌的自我防御也与几丁质酶有关（Miyamoto *et al.*，2012）。几丁质酶因能够抑制病原菌的生长，在农业生产、环境保护等方面具有广阔的应用前景。

目前关于几丁质酶的研究已经从酶的分离纯化发展到分子水平，许多研究者对生物的几丁质酶基因进行了克隆与表达。2012 年，韩国 Park 等（2012）对甜菜夜蛾中的几丁质酶基因做了相关的克隆表达及几丁质酶基因对应的氨基酸序列分析。Kopparapu 等（2012）也将 *Paecilomces thermophila* 中的几丁质酶基因在大肠杆菌中表达，并对测序得到的序列进行分析比对。同时瑞典 Ghasemi 等（2011）将短小芽胞杆菌 SG2 中的几丁质酶基因 *chiS* 和 *chiL* 的全长序列克隆入大肠杆菌 M-15 进行表达，并进行了纯化和生物特性研究。然而目前国内外关于短短芽胞杆菌几丁质酶基因的克隆与表达还未见报道，短短芽胞杆菌功能基因的研究还处于起步阶段。

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 是本实验室保存的一株具有抑菌活性的革兰氏阳性菌（车建美等，2010），在生物防治方面具有很好的应用前景。本研究将短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 中的几丁质酶基因在大肠杆菌中进行克隆和表达，进一步得到确切的几丁质酶基因序列及其表达分子质量，并对其对应的氨基酸序列作了预测分析，为几丁质酶进一步的研究打下良好的基础，同时为短短芽胞杆菌功能基因的研究提供技术参考。

二、研究方法

1. 菌株与质粒

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 为本实验室自己保存，大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存菌种，大肠杆菌 BL21（DE3）为福建省农业科学院植物保护研究所陈庆河研究员馈赠，载体 PMD18-T 购于 Takara 生物科技有限公司；pET28a 由福建省农业科学院土壤与肥料研究所贾宪波馈赠。LB 固体培养基：胰蛋白胨 1%、酵母浸粉 0.5%、NaCl 0.5%、琼脂 1.7%，pH7.0～7.2；LB 液体培养基：1% 胰蛋白胨、0.5%酵母浸粉、0.5% NaCl，pH7.0～7.2。

2. 酶与试剂

限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ购自 Takara 生物有限公司，细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 BioTeke 公司，2%的 X-Gal 和 20%的 IPTG（具体配制方法见分子克隆），dNTP 购自北京天根生物有限公司，3000bp Marker 购自 Ferments 生物有限公司，Mini Plasmid extraction kit 购自 OMEGA 生物有限公司。

3. 培养基

LB 液体培养基：胰蛋白胨 1%、酵母浸粉 0.5%、NaCl 0.5%，必要时添加 1.7%琼脂为固体培养基；在 LB 固体培养基中添加 40μl 2% X-Gal、7μl 20% IPTG 和 50μg/ml 氨苄西林作为阳性克隆筛选培养基；添加 50μg/ml 卡那霉素作为阳性转化子筛选培养基。

4. 引物与 PCR 扩增

以短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 全基因组测序得到的几丁质酶可读框为模板，设计特异性引物，引物两端分别添加 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ酶切位点，特异性扩增几丁质酶基因 *chiD*，引物序列为：chiD01 F'5′CGCGGATCCATGTATTTTTGATGAGAAAAGC 3′和 chiD02R'5′CCGCTCGAGTGACTTAATGAATCAAGCG AA CT 3′。以短短芽胞杆菌全基因组为模板进行特异性 PCR 扩增，扩增条件为 94℃，预变性 4min；然后 94℃变性 1min，60℃退火 1min，72℃延伸 1min，进行 35 个循环，最后 72℃延伸 10min。

5. 大肠杆菌菌株 DH5α 高效转化

利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增得到的几丁质酶基因序列产物，将其亚克隆到克隆载体 PMD18-T 上，连接反应 16℃过夜。再热激转化入感受态细胞大肠杆菌菌株 DH5α 中，用含有 40μl 2% X-Gal、7μl 20% IPTG 和 50μg/ml 氨苄西林的 LB 平板进行阳性克隆子的筛选，最后将获得的克隆子做特异性 PCR 扩增验证。

6. 氨基酸序列分析

提取 PMD18-T-chiD/DH5α 阳性克隆子菌株质粒用于测序，并在 ProtParam tool 在线软件中对相应的氨基酸序列进行分析，同时利用 Pfam 数据库在线预测分析氨基酸序列的功能区域和利用 signalP 数据库在线预测分析酶的信号肽序列，以及 NetNglyc 1.0server 软件进行 *N*-糖基化位点分析。

7. 重组表达载体 pET28a-chiD 的构建

以重组克隆载体 PMD18-T-chiD 为模板，chiD01 和 chiD02 为引物，PCR 扩增几丁质酶基因，扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化以后用限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切，酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收，与同样经过相同双酶切处理的表达载体 pET28a 连接，连接产物热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，并利用含有 50μg/ml 卡那霉素的 LB 固体平板筛选转化子，转化子进行特异性 PCR 和酶

切电泳鉴定，获得重组质粒 pET28a-chiD。

从重组大肠杆菌菌株 DH5α 中提取重组质粒 pET28a-chiD，将其转化入大肠杆菌菌株 BL21，得到阳性转化子，同样用特异性 PCR 和酶切电泳鉴定后获得阳性表达转化子。

8. 重组表达转化子诱导及 SDS-PAGE

将转化子转接入含卡那霉素的 LB 液体培养基中，培养至 OD 值为 0.8，加入不同浓度的 IPTG、不同诱导时间和温度诱导重组表达转化子，并利用 SDS-PAGE 摸索确定最佳的诱导表达条件。诱导条件的变化见表 3-3。

表 3-3　几丁质酶诱导条件

项目	编号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IPTG 溶液浓度/（mmol/L）	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0
培养时间/h	8	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16
培养温度/℃	28	30	37	28	30	37	28	30	37	28	30	37

三、几丁质酶氨基酸序列分析

经测序得到几丁质酶基因 *chiD* 序列片段为 1524bp，DNAman 翻译得到 507 个氨基酸，由 ProtParam tool 在线软件预测分析结果显示，该蛋白质的分子质量约为 54.55kDa，且其等电点为 5.77，说明该几丁质酶为酸性蛋白酶，与宋光明等（2008）报道获得的酸性几丁质酶（pH6.5）一致。如图 3-19 所示，经过 Pfam 数据库和 signalP 数据库预测分析氨基酸功能位点，结果表明此几丁质酶属于 18 家族的糖苷水解酶，其中第 1～30 位氨基酸为信号肽区域，第 31～59 位氨基酸的间隔区域为 N 端的酶底物结合区，第 88～163 位氨基酸间隔区域为纤连蛋白Ⅲ折叠区，第 183～487 位氨基酸的间隔区域为 C 端的酶催化区域，且 294 位氨基酸（谷氨酸）为预测的蛋白质活性位点。另外，NetNglyc 1.0server 软件进行 *N*-糖基化位点分析显示，氨基酸序列中存在 8 个 *N*-糖基化位点，分别为第 91 位、143 位、158 位、193 位、231 位、259 位、309 位和 491 位氨基酸。*N*-糖基化一般发生在天冬氨酸上而且出现位点一般为 Asn-Xaa-Ser/Thr（Xaa 是除脯氨酸外的任何氨基酸）。

四、重组表达载体 pET28a-chiD 的构建

将经限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切的几丁质酶基因片段和同样经双酶切处理的表达载体 pET28a 用 T4 连接酶进行连接反应，热激转化大肠杆菌菌株 DH5α，挑取单菌落进行 PCR 检测，见图 3-20，PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后，发现在约 1500bp 处有清晰条带显示，初步确定为阳性转化子，进一步对阳性克隆中的重组质粒进行提纯，用限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切，经 1%琼脂糖凝胶电泳后，在约 1500bp 处出现清晰条带（图 3-21），最终确定为阳性转化子，将获得的重组质粒送至上海博尚生物技术有限公司测序，结果显示序列匹配率为 100%，说明在重组表达载体的构建过程中，

几丁质酶基因并没有发生突变且正确连接到表达载体 pET28a 上。

30　59

MYFLMRKAGVLVVLSLLLIFSLFPQSSHAMAPWTPNTVYKVGDMVTYQGQDYKCTFAHTSLVG

88

WEPPNVPTLWQLQGPSAPDTIPPTSPTNLSEVGKTSSSVSLSWSASTDDRAVKEYLVYNGDTLAGI

163　183

SSTTSYTVTGLLANTTYSFTIQAKDAAGNVSPPSASITVTTLSTSPNEPVSKRVLIGYWHNFDNGST

VLKLRDVSDKYDVINVAFAEPVGGDHATMGFVPFNASVEEFKSDIALLQSKGKKVLISIGGANGT

294

VELTTEAAKQSFITSMTSIIQTYGFDGMDIDLEGSSLSLNAGDTDFKNPTTPKIKNLIAATQTITNTF

GSSFILTMAPETAYVQGGYAAYGGPWGAYLPVIHALRDRMNYIHVQHYNSGALEALDGRTYQQG

TADFQVAMAEMLLKGFPIGRNPNNMFPALRENQVAIGLPSAPSAAGGGYTSPADIQKALHYLVKG

487

TSFGGTYKLQNPAGYPQFQGVMTWSINWDARNNYSFANQVRSPLDSLSQ

图 3-19　短短芽胞杆菌几丁质酶基因 *chiD* 氨基酸序列分析

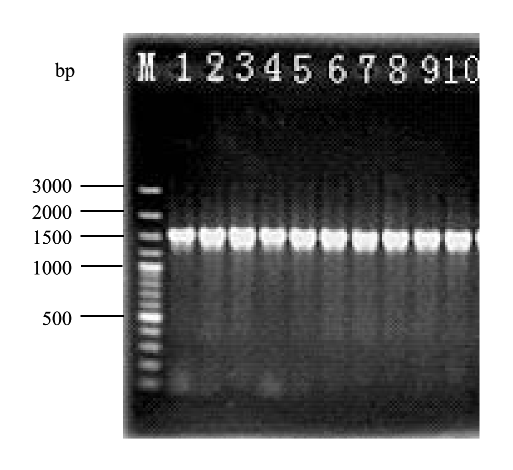


图 3-20　重组载体 PCR 验证电泳图

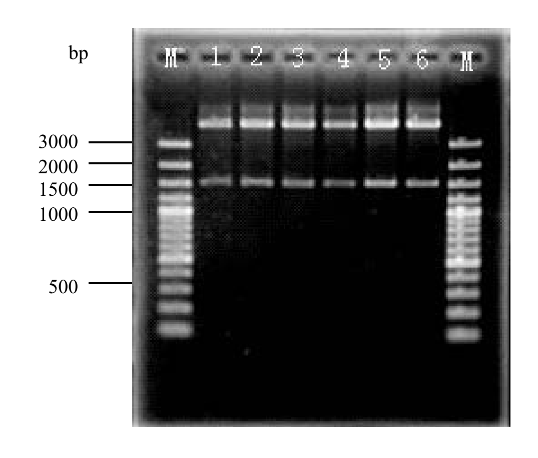


图 3-21　重组质粒载体双酶切验证电泳图

五、重组几丁质酶的诱导表达

由于表达载体 pET28a 自身携带 T7 启动子和终止子，因而可以在外源基因没有携带表达元件的情况下表达外源基因。利用不同浓度的 IPTG、诱导时间和温度诱导几丁质酶基因的表达，并采用 SDS-PAGE 检测酶的表达情况，图 3-22 显示，当 IPTG 浓度为 0.5mmol/L，且在 28℃条件下诱导表达 8h 时，在约 55kDa 处出现清晰的目标蛋白质条带，且在只含表达载体的大肠杆菌 BL21 的对照组中没有出现对应的条带，因此可确定重组表达载体 pET28a-chiD 得以成功表达，同时诱导表达量最高。在图 3-23 和图 3-24 的对比中发现，其他诱导条件的蛋白质电泳在相同位置同样出现目标条带，但均较弱，由此

说明在 IPTG 浓度为 0.5mmol/L，且在 28℃条件下诱导表达 8h 时，蛋白质表达量最高。

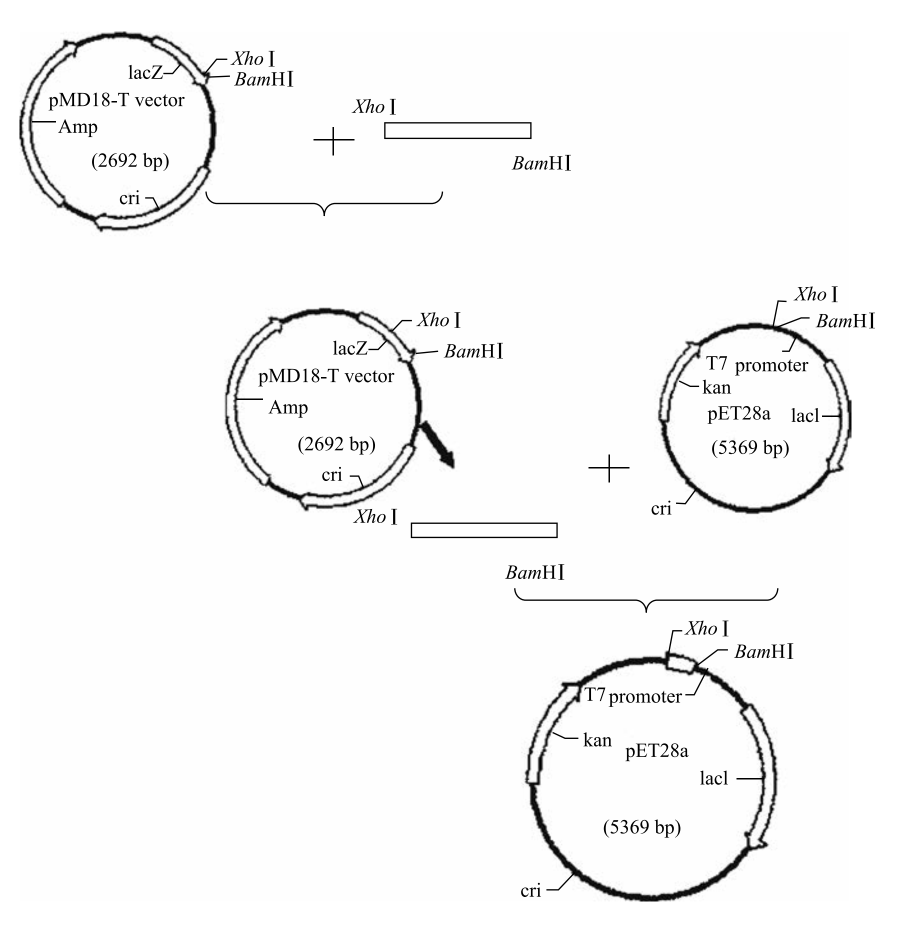


图 3-22　重组表达载体 pET28a-chiD 的构建图谱

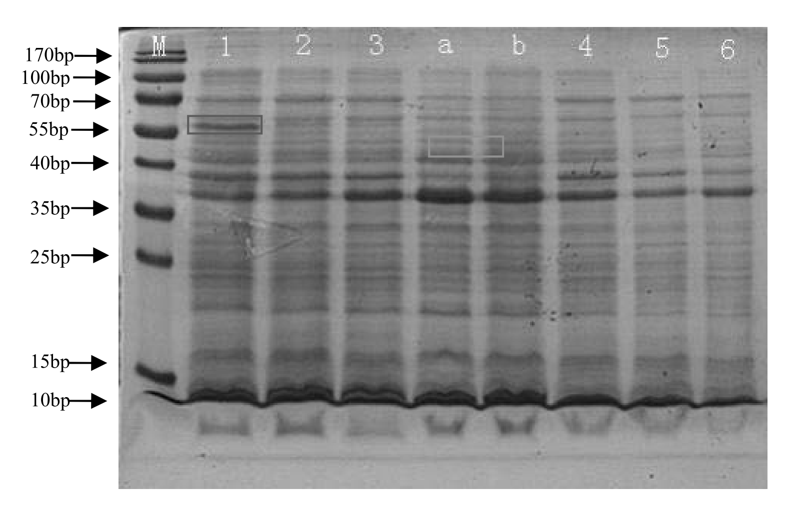


图 3-23　重组载体诱导 8h 后电泳结果

泳道 a 和 b 为质粒 pET28a 的诱导结果，作为对照；图中编号 1～6 对应着表 3-3 中的编号

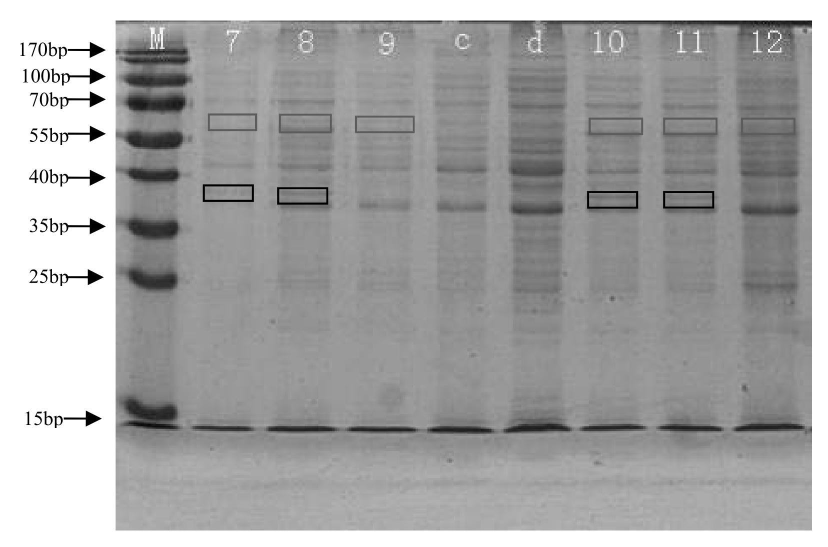


图 3-24　重组载体诱导 16h 后电泳结果

泳道 c 和 d 为质粒 pET28a 的诱导结果，作为对照；图中编号 7～12 对应表 3-3 中的编号

六、讨论

自 Karrer 和 Hofmann（1929）从蜗牛胃液中发现几丁质酶后，关于几丁质酶的研究开始受到国内外广泛关注。到目前为止，已在许多动物、昆虫和微生物中发现几丁质酶基因的存在。国内外关于微生物几丁质酶基因的重组表达及应用方面的研究取得了一定进展。Driss 等（2011）将几丁质酶成功应用于 *B. thuringiensis* 细胞外毒素的重组表达以增强其抗虫活性。Hu 等（2009）将苏云金芽胞杆菌中的几丁质酶基因和毒蛋白基因整合在一起进行组成型表达，以增加毒蛋白对农业害虫的毒害作用。Huang 等（2012）认为强酸的化学水解反应在生产 β-1,4-*N*-乙酰-D-葡萄糖胺（GlcNAc）时容易造成环境污染，几丁质酶对几丁质的水解将会是生产 GlcNAc 及其低聚糖的有效环保型方法。因此 Martinez 等（2012）报道工程几丁质酶已成功应用于几丁质低聚糖的合成。另外，几丁质酶对几丁质的降解途径已经得到具体阐述：一般情况下，几丁质酶对几丁质的降解主要由两种不同几丁质酶的参与，首先是内切几丁质酶将几丁质水解成 *N*, *N*-二乙酰壳二糖苷组成的小分子低聚糖，再由外切 β-*N*-氨基葡萄糖苷酶将这些低聚糖降解为 β-1,4-*N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺（Cohen-Kupiec and Chet，1998）。对几丁质酶降解几丁质途径的研究为如何提高几丁质降解功能的研究奠定基础。

本实验将短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 中的几丁质酶基因 *chiD* 通过载体 pMD18-T 克隆入大肠杆菌菌株 DH5α，通过测定重组载体 pMD18T-chiD 的基因序列预测几丁质酶的分子质量、蛋白质功能位点等性质。将双酶切的几丁质酶基因片段与表达载体 pET28a 连接构建重组表达载体 pET28a-chiD，在大肠杆菌菌株 BL21（DE3）中顺利表达得到 55kDa 左右的蛋白质，并优化出表达的最佳诱导条件为 28℃、8h 和 0.5mmol/L IPTG。同时，丁存宝等（2009）从短芽胞杆菌属细菌中纯化得到的几丁质酶最适 pH 为 7.5（丁

存宝等，2009），李盛（2010）也报道短芽胞杆菌 No.G1 的几丁质酶最适 pH 为 8.0（李盛等，2010），而本实验重组表达的几丁质酶为酸性几丁质酶，与上述报道的几丁质酶酸碱性存在差异，说明短芽胞杆菌属细菌的几丁质酶存在多样性。另外，实验中采用的供试菌株具有较好的抗真菌活性和水果保鲜效果，对其抑菌粗提物质的特性也做了初步的研究，其几丁质酶的抑菌活性有待研究。但是短芽胞杆菌属细菌作为生防菌，关于其几丁质酶的研究大多停留在分离纯化层面，几丁质酶基因构建重组表达载体的报道暂时不多，而其中短短芽胞杆菌中几丁质酶基因的克隆表达研究尚未见报道。本实验构建了短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 基因克隆表达体系，为其他基因的研究提供平台，但对重组表达的几丁质酶的相关酶学性质和功能调控机制还需要在今后的工作中进一步研究。

第六节　芽胞杆菌绿色荧光蛋白基因转导

一、蟠状芽胞杆菌绿色荧光蛋白基因转导

1. 概述

对生防菌定殖的追踪和监测对研究生防菌的生防机制至关重要，很久以来，抗生素标记成为人们常用的手段（Ramos *et al.*，2002；董越梅等，2000），但这种方法不易区别环境中对标记抗生素有同样抗性的土著微生物，而且使用选择平板法并不能明确细菌在根周围小生境的空间分布。标记基因技术的建立与发展，为生防细菌定殖的微生态学研究提供了有效手段。其中绿色荧光蛋白（GFP）因为荧光性能稳定、检测方便以及表达不受受体种属限制等特性，而越来越为人们所重视（董越梅等，2000），并被成功地用于研究细菌在植物根部的定殖（张昕等，2007）。张昕等（2005）将具有绿色荧光蛋白标记和氯霉素抗性的重组质粒 pRP22-GFP 导入生防菌 *B. brevis*ZJY-1 和 *B. subtilis* ZJY-116 中，用这些标记菌株处理黄瓜种子，出苗后通过定期分离计数具有上述表型的转化子，研究了两株生防菌在黄瓜根围的定殖规律，结果表明，在整个生育期两株生防菌株均能在黄瓜根围有效定殖，并在黄瓜盛花期和盛果期出现数量高峰。Monika 等（2006）通过 *gfp* 标记的生防菌 *Pseudomonas putida* PRD16 和 *Enterobacter cowanii* PRF116 菌株，比较了两个菌株在根际土壤和番茄植株内的定殖能力及其对根际微生态的影响。

青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A，由福建省农业科学院农业生物资源研究所农业微生物研究中心自番茄植株根际土壤分离获得，对不同作物的青枯雷尔氏菌具有较强的抑菌作用（Monika *et al.*，2006；刘波和朱昌雄，2000；曹宜等，2003；朱育菁等，2004），对青枯病具有较好的防效（朱育菁等，2004），但是目前未见关于青枯病生防菌 *gfp* 基因标记方面的报道，研究利用 *gfp* 基因标记蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A，采用荧光显微镜、激光共聚焦电镜等观察其在番茄根际土壤的定殖规律，可以实现生防菌定殖的追踪分析，进行与番茄青枯病原菌生态竞争作用的动态观察，从而为更加深入研究番茄青枯病生防菌的防病促生作用机制奠定基础。研究主要通过比较不同质粒含量和不同感受态细胞浓度对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 电击转化效率的影响，优化蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的电击条件，获得 *gfp* 基因稳定标记的青枯病生防菌，并研究了标记的青枯

病生防菌的生理生化特性及其对不同作物分离的青枯雷尔氏菌的抑菌作用，为进行生防菌的定殖观察奠定基础，并为植物根际有益微生物的个体生态学提供实验参数。研究方法如下。

1）菌株和质粒：大肠杆菌菌株 DH5α 为质粒 pCM20 的宿主菌，其中带有红霉素抗性基因和 *gfp* 基因。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 及大肠杆菌菌株 DH5α 的培养基为 LB 培养基；质粒大量提取及纯化试剂盒为德国 QIAGEN 公司的 QIAGEN Plasmid Maxiprep Kit；抗生素红霉素购自 Sigma 公司；电转化仪为 Bio-Rad Gene Pulser II；立体荧光显微镜（Leica MZ12）为瑞士莱卡仪器公司产品。凝胶成像仪 BIO-RAD Universal Hood Gel-Doc UV Imaging System、离心机为德国生产的 Hettich mikro 200R。

2）质粒 DNA 的提取和电击转化：从含 150μg/ml 红霉素的 LB 平板中挑取新鲜培养的在荧光显微镜下发绿色荧光的质粒宿主菌 DH5α 的一个单菌落，置于 100ml 含 150μg/ml 红霉素的 LB 液体培养基中，37℃条件下振荡培养 16～18h 后，进行质粒提取，质粒提取及纯化步骤按 QIAGEN 质粒大量提取试剂盒提供的方法进行。电击转化条件的优化：电击条件为 2.5kV，200Ω，25μF，电击转化条件见表 3-4。质粒 DNA 的含量分别为 118ng、236ng 和 354ng，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 感受态细胞浓度为 1.14×10^8CFU/ml 和 3.42×10^8CFU/ml，电击结束立即加入 800μl 的 LB 培养基，混匀并转入 1.5ml 的 Eppendorf 管中，于 30℃、120r/min 的摇床上振荡培养 2h，取适量菌液涂布在含有 10μg/ml 红霉素的 LB 培养基上，30℃培养至长出单菌落。阳性转化子的荧光检测：将含有 10μg/ml 红霉素的 LB 选择平板直接放在 Leica 立体荧光显微镜下，立体荧光显微镜所用激发光滤片为 480nm，阻挡滤片为 510nm，通过观察菌落发出的绿色荧光直接筛选阳性转化子，命名为蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20。取少量处于对数生长期的细胞，涂布在滴有一滴无菌水的载玻片上，制片后在激光共聚焦显微镜下检测荧光，并观察在激光共聚焦显微镜下的细胞形态。

表 3-4　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 转化条件的优化

质粒 DNA 含量/ng	感受态细胞数量/（$\times10^8$CFU/ml）
118	1.14
118	3.42
236	1.14
236	3.42
354	1.14
354	3.42

3）蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌株的生物学特性

1）转化菌株 *gfp* 基因表达稳定性的检测：挑取固体平板上的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 发光单菌落于 5ml M9 和含有 10μg/ml 红霉素的 M9 培养基中，30℃、200r/min 振荡培养，按照 1%的比例接于 20ml M9 和含有 10μg/ml 红霉素的 M9 培养基中，30℃、200r/min 振荡培养，每隔一段时间取一次样品，采用流式细胞分选仪测定 *gfp* 的

表达情况。实验重复 3 次。

2）转化菌株生长曲线的比较：分别挑取固体平板上的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A、蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 发光单菌落于 5ml LB 和含有 10μg/ml 红霉素的 LB 培养基中，30℃，振荡培养过夜，按照 1%的比例接于 20ml LB 和含有 10μg/ml 红霉素的 LB 培养基中，30℃、200r/min 振荡培养，每 1h 取一次样品，测定 OD_{600} 值，并绘制生长曲线。实验重复 3 次。

3）不同温度对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 生长的影响：按照 1%的比例将新鲜培养的标记前后的菌株（蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20）培养液接入 LB 液体培养基（装瓶量 25ml/250ml）和含有 10μg/ml 红霉素的 LB 液体培养基中，分别于 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃，200r/min 摇床培养，培养 24h 后，分别取 1ml 菌液进行梯度稀释，取 200μl 涂布 LB 固体平板和含有 10μg/ml 红霉素的 LB 固体平板，30℃培养 24h 后统计菌体数量。实验重复 3 次。

4）不同摇床转速对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 生长的影响：按照 1%的比例将新鲜培养的标记前后的菌株（蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20）培养液接入 LB 液体培养基中（装瓶量 25ml/250ml）和含有 10μg/ml 红霉素的 LB 液体培养基，分别于 50r/min、100r/min、150r/min、200r/min、250r/min 摇床培养，培养温度为 30℃。培养 24h 后，分别取 1ml 菌液进行梯度稀释，取 200μl 涂布 LB 固体平板和含有 10μg/ml 红霉素的 LB 固体平板，30℃培养 24h 后统计菌体数量。实验重复 3 次。

5）蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同作物的青枯雷尔氏菌的抑制作用：分别挑取青枯雷尔氏菌（表 3-5）单菌落于装有 25ml 的 SPA 培养液的 250ml 三角瓶中，置于 30℃、200r/min 摇床培养 48h，每株青枯病原菌进行三个处理。挑取 ANTI8098A 和 ANTI8098A-GFP 单菌落于装有 25ml 的 LB 培养液的 250ml 三角瓶中，置于 30℃、170r/min 摇床培养 48h。分别取 5ml 青枯雷尔氏菌菌液与 ANTI 菌液等比例混合，置于已灭菌试管中，于 30℃培养箱静置 36h，以无菌水与青枯雷尔氏菌菌液混合作对照。将混合菌液混匀，稀释到浓度为 10^{-6}，将 10^{-5}、10^{-6} 两个浓度涂 TTC（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）平板［TTC 培养基：蛋白胨 10.0g/L、水解酪蛋白 1.0g/L、葡萄糖 5.0g/L、TTC 0.05g/L（TTC 用蒸馏水配成 1%溶液并用细菌过滤器过滤灭菌，在培养基倒平板前冷却至约 50℃），pH7.0～7.2］，每浓度两个平板。置于 30℃培养 3d，观察青枯雷尔氏菌生长情况，统计数量，比较蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同作物青枯雷尔氏菌的抑制作用。

表 3-5　供试青枯雷尔氏菌菌株

菌株名称	寄主植株	采集地点
Rs-L.352300-060722-14-1-1	辣椒	宁德屏南
Rs-F.1.3-010702-01V-f13	番茄	福州北峰
Rs-J.1.4-010704-01V	生姜	福州永泰

2. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A GFP 转化条件优化

电击条件的优化实验结果见表 3-6。随着质粒 DNA 含量的增加，得到的转化子逐渐减少，同时，随着感受态细胞浓度的增加，得到的转化子也呈现减少的趋势，当质粒 DNA 含量为 118ng、感受态细胞浓度 1.14×10^8CFU/ml 时，得到的转化子为 1570 个/ml；当质粒 DNA 含量为 236ng、感受态细胞浓度 1.14×10^8CFU/ml 时，得到的转化子为 355 个/ml；当质粒 DNA 含量为 354ng、感受态细胞浓度 1.14×10^8CFU/ml 时，得到的转化子为 330 个/ml，并且电击时，容易出现电火花，不利于转化的进行。对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 进行电击转化的最佳条件为质粒 DNA 含量为 118ng，感受态细胞浓度为 1.14×10^8CFU/ml。

表 3-6　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 转化条件的优化

质粒 DNA 含量/ng	感受态细胞浓度数量/（$\times10^8$CFU/ml）	转化子数量/（个/ml）
118	1.14	1570
118	3.42	280
236	1.14	355
236	3.42	115
354	1.14	330
354	3.42	70

3. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A GFP 转化子荧光检测

实验结果见图 3-25～图 3-28。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 在 LB 培养基上生长良好，菌落圆形，扩展速度快，表面乳白色，菌苔较厚，中间微凸起，边缘半光滑且整齐。在 37℃条件下培养 48h 菌苔丰满有光泽，其菌体细胞呈杆状。本实验成功得到 *gfp* 基因标记的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌落为圆形，在荧光显微镜下发绿色荧光，菌落形态与蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 相似。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌体细胞形状与蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 相同，均为杆状，在荧光下呈现绿色，而在正常光照下，则为黑白颜色。菌体细胞可以单独存在，也可以多个连在一起，呈多联体状态存在。

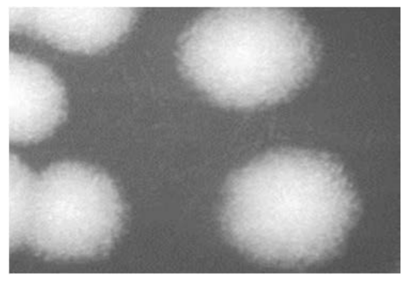


图 3-25　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌落形态

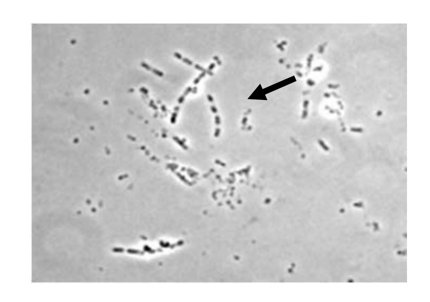


图 3-26　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌体细胞形态

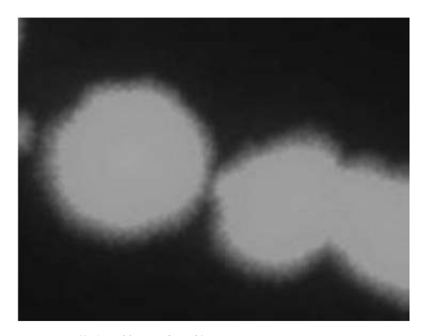


图 3-27　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的菌落形态（荧光下）

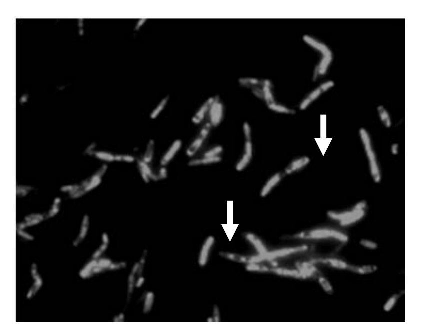


图 3-28　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A: pCM20 的菌体细胞形态（荧光下）

4. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A GFP 荧光表达的稳定性

实验结果见图 3-29。在含有红霉素选择压力的 M9 培养基中，在培养 24h 时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 中绿色荧光菌体细胞含量为 99.2%，培养 48h 后，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 中绿色荧光菌体细胞含量为 94.45%，培养 90h 后，绿色荧光菌体细胞含量为 72.69%。在无红霉素选择压力的 M9 培养基中，在培养 24h 时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 中绿色荧光菌体细胞含量为 98.99%，培养 48h 后，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 中绿色荧光菌体细胞含量仍为 70.98%，培养 90h 后，绿色荧光菌体细胞含量为 19.87%。因此选择压力对绿色荧光蛋白的表达有一定影响，但是并不会影响到对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 定殖的观察和监测。

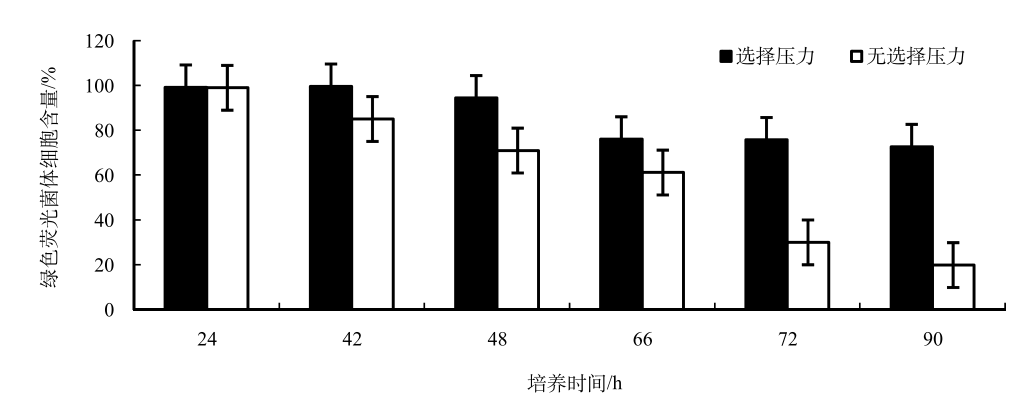


图 3-29　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在选择压力和无选择压力下的生长

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的生长模型，实验结果见图 3-30。在含有红霉素的 LB 培养基中，培养 0～4h 为蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 生长的起始期，菌株生长缓慢；4h 之后，开始进入对数生长时期，菌体数量迅速增加，一直到培养 8h，菌株的生长开始进入稳定时期，生长平缓。而在 LB 培养基中，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的生长速度比蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 快，0～1h 为生长的起始时期，菌株开始生长，1h 后进入对数生长时期，菌体数量迅速增加，6h 后进入生长的稳定期，菌体数

量变化不大。

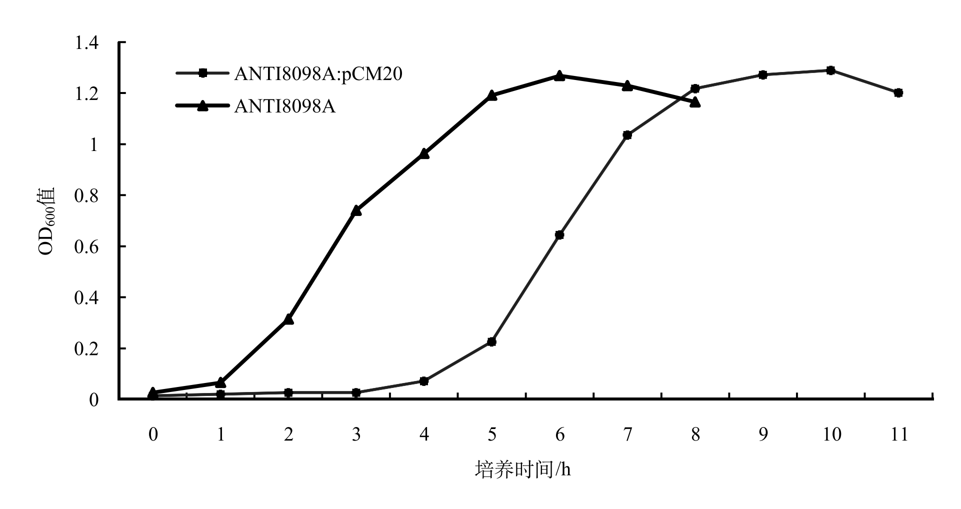


图 3-30　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 生长曲线的比较

5. 温度对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A GFP 转化子生长的影响

实验结果见图 3-31。不同温度条件下培养 24h 后，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 生长速度不同，随着培养温度的升高，两个菌株的生长明显增快。

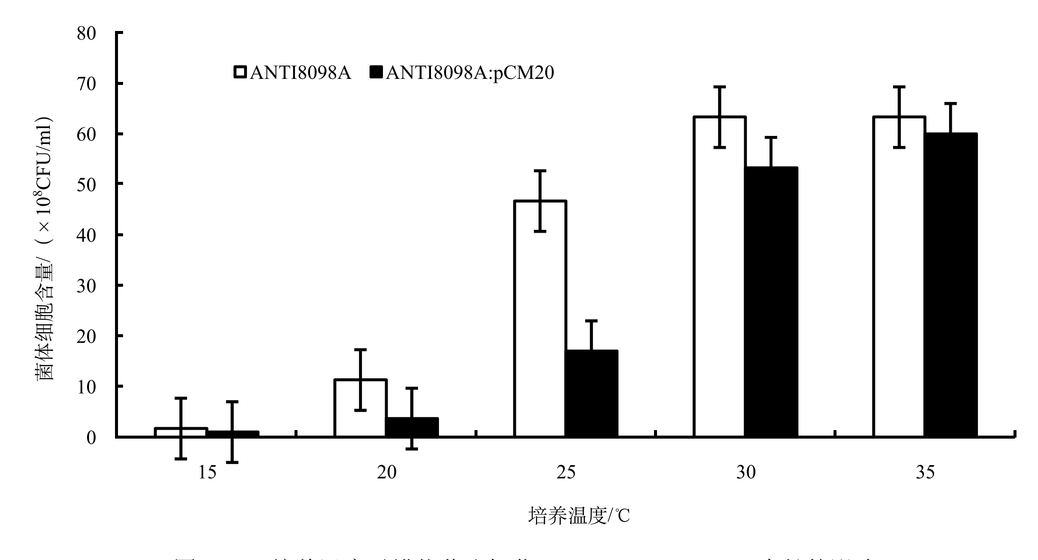


图 3-31　培养温度对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 生长的影响

在不同培养温度条件下，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌体含量比蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌体含量高，当培养温度为 15℃时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌体细胞含量为 1.7×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含量为

1.0×10^8CFU/ml；当培养温度为 20℃时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌体细胞含量为 11.3×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含量为 3.0×10^8CFU/ml；当培养温度为 25℃时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌体细胞含量为 46.7×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含量为 17.0×10^8CFU/ml；当培养温度为 35℃时，两个菌株的菌体含量均增加，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的菌体细胞含量为 63.3×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含量为 60.0×10^8CFU/ml。因此，随着培养温度的升高，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的生长速度均加快，菌体细胞含量增加，而蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的生长较蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 更快。

6. 通气量（培养转速）对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A GFP 转化子生长的影响

实验结果见图 3-32。随着培养摇床转速的增加，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌株的生长加快，含菌量增加，当培养转速为 50r/min 时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的含菌量为 2.25×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含菌量为 1.43×10^8CFU/ml；当培养转速为 100r/min 时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的含菌量为 21.0×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含菌量为 20.6×10^8CFU/ml；当培养转速为 200r/min 时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的含菌量为 46.67×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含菌量为 44.67×10^8CFU/ml；当培养转速为 250r/min 时，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的含菌量为 56.67×10^8CFU/ml，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的含菌量为 50.33×10^8CFU/ml；因此，随着培养转速的升高，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的生长速度均加快，含菌量增加，而蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的生长较蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 更快。

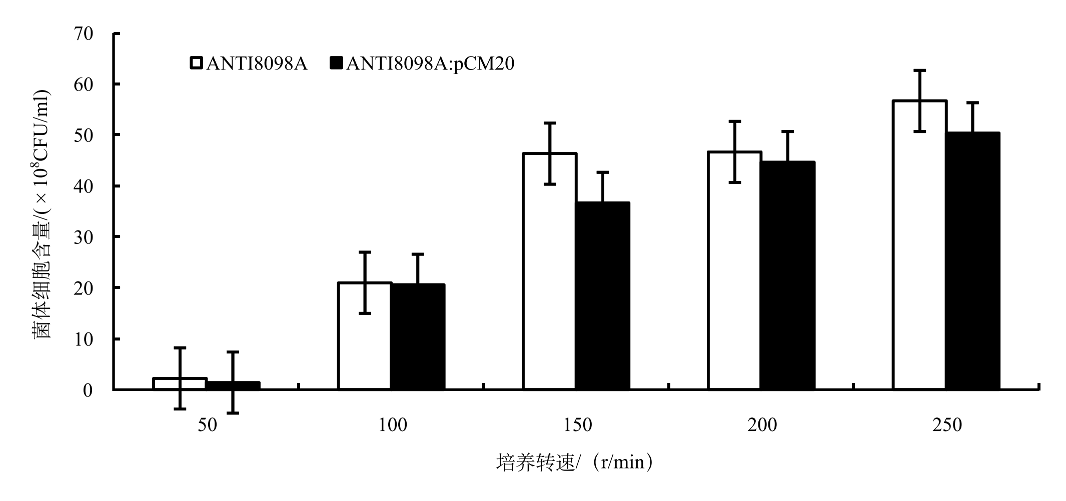


图 3-32　培养转速对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 生长的影响

7. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A GFP 转化子对青枯雷尔氏菌的抑制作用

蜡状芽胞杆菌 ANTI8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同作物青枯雷尔氏菌（*Ralstonia solanacearum*）的抑制作用结果见表 3-7 和图 3-33～图 3-35。由表 3-7 可以看出，蜡状芽胞杆菌 ANTI8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同作物分离的青枯雷尔氏菌的抑制作用无显著差异，对于从生姜上分离的青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01V，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的抑菌率更高，蜡状芽胞杆菌 ANTI8098A 的抑制率是 94%，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的抑制率是 100%；而对于番茄分离的青枯雷尔氏菌 Rs-F.1.3-010702-01V-f13，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的抑制率稍有下降，ANTI8098A 的抑制率是 100%，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的抑制率是 91.1%；蜡状芽胞杆菌 ANTI8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对辣椒上分离的青枯雷尔氏菌 Rs-L.352300-060722-14-1-1 的抑制率相同，均为 100%。

表 3-7　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同作物青枯雷尔氏菌的抑菌率

处理	生防菌对不同作物青枯雷尔氏菌的抑菌率/%		
	Rs-J.1.4-010704-01V	Rs-F.1.3-010702-01V-f13	Rs-L.352300-060722-14-1-1
蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A	94	100	100
蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20	100	91.1	100
无菌水（CK）	0	0	0

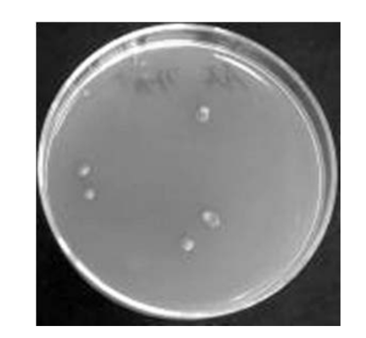


图 3-33　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对 Rs-J.1.4-010704-01V 菌株抑制作用

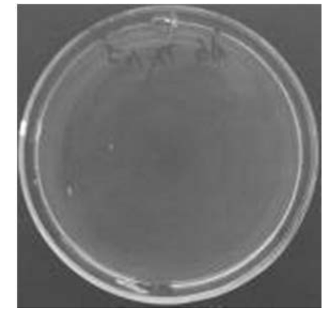


图 3-34　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对 Rs-J.1.4-010704-01V 菌株的抑制作用

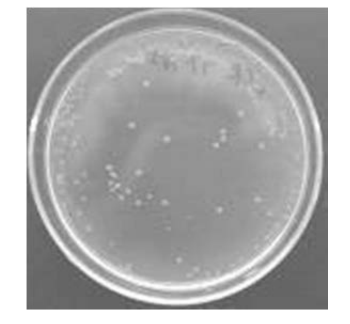


图 3-35　无菌水对 Rs-J.1.4-010704-01V 菌株的抑制作用

8. 讨论

利用微生物特别是芽胞杆菌防治青枯病受到了人们重视，用于防治青枯病的生防菌有荧光假单胞杆菌（陈旋，2006）、多粘类芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌等（魏海雷等，2004；谢晶等，2004）。生防菌要发挥其作用效果的一个前提条件就是要能够进行有效的定殖（Kyungseok *et al.*，2007；张庆华等，2001；陈营等，1999；Unge *et al.*，1999），但是

长期以来一直缺乏直观有效的技术手段对其定殖规律及作用机制进行深入的研究，从而制约了其进一步发展，利用 *gfp* 标记能够有效区分接种的目标菌和土壤及植物中存在的土著菌，并且有利于实时、原位观测目标菌的存活状态，并且可以直接估算菌群的数量。尽管有许多芽胞杆菌转 *gfp* 基因的报道，但至今未见青枯病生防菌 *gfp* 基因转导方面的报道。

大量的实验表明，借助于 GFP 标记技术研究细菌的定殖规律具有很多优越性。GFP 标记在实时、原位研究微生物的空间定位、微生物与环境及宿主相互作用等方面展示了良好的应用前景。利用基因标记研究生防菌的应用已经引起了许多学者的兴趣。从 1996 年起，该 GFP 标记系统被广泛应用于各种环境微生物研究中，如水环境（Siemering *et al.*，1996）、土壤（Leff L G and Leff A A，1996）、根际（Ahn *et al.*，2001）、活性淤泥（Normander *et al.*，1999）、生物被膜（Eberl *et al.*，1997）等。例如，将 GFP 标记方法用于研究根瘤细菌在根际的动态变化和空间分布（Skillman *et al.*，1998）；还用于生物被膜内各细菌之间基因漂移现象的研究（周俊初等，2001）。但是在青枯病生防菌的研究机理中，未见该方面的报道。

田兴山等（2005）发现，乳酸杆菌菌株 Lac1001 的生长时期对转化率表现出较大的影响，当 OD_{600} 为 0.6 时的转化率最高，为 1μg DNA 获得 3.2×10^4 个转化子，随着菌株 Lac1001 培养时间的延长，电击转化率反而下降，说明使用处于对数生长期的细胞可以获得较高的转化效果。作者的结果与之相同，感受态细胞的生长时期对转化效率影响很大，同时，质粒浓度对电击转化效率也具有一定影响，不同浓度的质粒转化效率也有所不同。

对于 *gfp* 标记后菌株稳定性的检测是进行生防菌定殖机理研究的先决条件（范晓静等，2008；刘芳和梁云祥，2005；Arana *et al.*，2003），荧光假单胞菌株 JK45 的标记菌株在 LB 平板上和加抗生素的 LB 平板上连续传代 15 次，仍然能够稳定发光，表明标记菌株具有较好的遗传稳定性，并且标记菌株和初发菌株的生长趋势基本一致，标记菌株 JK45-L 的对数期比初发菌株 JK45 要延长约 4h（贾艳华，2005）。在对蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和标记菌株生长曲线比较中发现，标记菌株和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的生长趋势基本相同，虽然生长速度比蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 缓慢，但在培养 12h 后两个菌株的最终菌体数量基本相同。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 绿色荧光表达稳定，在具有选择压力的条件下，培养 90h 后，绿色荧光菌体细胞含量为 72.69%，在无选择压力存在的条件下培养 48h 后，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 中绿色荧光菌体细胞含量仍为 70.98%，因而，该标记菌株可以用于生防菌在植株根部定殖监测的研究。

朱红梅等（2006）的研究结果表明，将带有 *gfp* 标记基因的 pGLO 质粒成功转化到肠毒素型大肠杆菌菌株 K_{88}、K_{99} 中，经过紫外检测及荧光显微镜检测均发现转化菌株发出绿色的荧光，表明该基因得到稳定、高效的表达。进一步通过 PCR 分子鉴定、血清型鉴定、微生物学特性分析表明，转化菌株与原始菌株是一致的。作者的研究结果与之一致，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 标记后的生物学特性并未受到转化质粒的影响，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的生物学特性与野生型菌株相同。

转化前后生防菌的抑菌效果对于研究生防菌的生防机理非常重要，贾艳华（2005）

在采用红色荧光蛋白基因标记荧光假单胞菌进行室内平板抑菌实验结果表明，*rfp* 标记菌株 8’P303，12P303 与出发菌 P303 的抑菌活性相当，都对烟草赤星青霉、黄瓜炭疽、油菜立枯、萝卜褐腐等多种真菌有较强抑制作用。作者的研究结果与之相同，对不同作物分离的青枯雷尔氏菌的抑菌实验结果表明，蜡状芽胞杆菌 ANTI8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同作物分离的青枯雷尔氏菌的抑制作用无显著差异，抑制效果显著高于对照。

采用 *gfp* 基因标记青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 后，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的生物学特性未发生变化，*gfp* 基因表达比较稳定，因而，可以很好地将其应用于根际土壤定殖的观察。青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的成功标记将有助于更加直观地研究生防菌在植物根际土壤的定殖状态、数量及分布规律，更好地观察生防菌对植物根际微生物的动态影响，从而为进一步阐明生防菌的生防机理奠定基础。

二、短短芽胞杆菌绿色荧光蛋白基因的转导

1. 概述

枯萎病是作物和蔬菜生产中的毁灭性病害，目前生产上虽然使用大量杀菌剂进行防治，但是结果都不理想。在枯萎病的防治方面，鉴于缺乏有效的化学药剂，也没有适宜本地栽培的有效抗病品种，人们希望在生物防治上找到突破口（Vimal *et al.*，2008）。孙正祥等（2008）分离到对香蕉枯萎病病原菌具有很强抑制作用的枯草芽胞杆菌。曹理想等（2003）从香蕉组织内分离的几株内生菌对该病有不同程度的抑制作用，但抑制效果不理想。据报道，橄榄产色链霉菌（*Streptomyces olivochromogenes*）（邱炜等，2009）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）（李晶等，2009；王娜和许雷，2007；殷晓敏，2008）、荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）（岳东霞等，2008）和非致病性镰刀菌（钱晓雍等，2007）等对不同作物的枯萎病菌都具有明显的抑制作用。

但是，由于难以区分目标微生物和根际土壤内的其他相似微生物，因而很难对生防菌的生防机理进行详细的分析和研究（王震等，2007）。绿色荧光蛋白标记系统具有标记基因小（约 800bp）、肉眼直接检测荧光、对细胞安全、稳定等优点（Arana *et al.*，2003；Oh *et al.*，2004），已被成功用于微生物定殖（周俊初等，2001）、对宿主组织侵染（Nonomura *et al.*，2003）、微生物动态监测（钟卫鸿等，2005）等研究。王浩等（2006）用 *gfp* 基因标记法研究大豆根瘤菌在大豆根部定殖结瘤情况，发现 *gfp* 标记菌 CCBAU01287（G）可用于实时监测根瘤菌在大豆根部的早期定殖情况和定殖密度的测定。本节拟用 *gfp* 基因标记枯萎病生防菌 JK-2，并采用抑菌率法研究其标记前后对不同植物枯萎病病原菌的抑菌作用。实验方法如下。

枯萎病生防菌 JK-2（短短芽胞杆菌，*B. brevis*）是本实验室从发生枯萎病的田块分离得到的一株拮抗菌株，对枯萎病病原菌具有较强的抑制作用。供试的不同专化型的尖孢镰刀菌菌株为本实验室从不同植物寄主中分离得到（表 3-8）。大肠杆菌菌株 DH5α 为质粒 pCM20 宿主菌，其中带有红霉素抗性基因和 *gfp* 基因。菌株 JK-2 及大肠杆菌菌株 DH5α 的培养基为 LB 培养基。

表 3-8 供试尖孢镰刀菌菌株

菌种编号	菌种名称	专化型	采集地点
FJAT-370	F-B.6.0-050329-B5	尖孢镰刀菌古巴专化型	福建漳州
FJAT-121	F-H.6.5-030318-J1	尖孢镰刀菌黄瓜专化型	漳州诏安
FJAT-129	F-T.1.7-030514-12	尖孢镰刀菌甜瓜专化型	福州永泰
FJAT-136	F-X.1.7-030520-12	尖孢镰刀菌西瓜专化型	福州永泰

短短芽胞杆菌 JK-2 的电击转化：在 LB 液体培养基中振荡培养短短芽胞杆菌 JK-2 至 OD_{600} 为 0.6，取菌液冰浴 10min，8000r/min 4℃离心收集菌体。用预冷的无菌水洗菌体 4 次备用。2mm 电转化杯冰上预冷后，分别加入 200μl 感受态细胞和适量质粒 DNA，冰浴 10min 后进行电击转化，电击条件为 2.5kV、200Ω、25μF。电击结束立即加入 LB 液体培养基，混匀并转入 1.5ml 的 Eppendorf 管中，于 37℃、120r/min 的摇床上振荡培养 2h，取适量菌液涂布在含有 10μg/ml Em 的 LB 培养基上，37℃培养至长出单菌落。将含有 Em 的 LB 平板置于立体荧光显微镜下，立体荧光显微镜所用激发光滤片为 480nm，阻挡滤片 510nm，通过观察菌落发出的绿色荧光直接筛选阳性转化子。用接种环挑取适量标记菌，常规制片，荧光显微镜观察、拍照。筛选的转化子定名为 JK-2:pCM20。

短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的生长特性：①短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的生长曲线，将短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 在含红霉素的 LB 平板上划线培养，然后挑取单菌落接种到含红霉素的 LB 液体培养基中培养过夜。以 1%接种量（体积分数）分别接种于 250ml 三角瓶中（装液量 25ml），37℃、120r/min 培养。定期取样，测定菌悬液的 OD_{600} 值，以空白培养基为对照，重复 3 次。②短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的遗传稳定性测定，将培养的短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 种子液用新鲜的 LB 液体培养基洗去抗生素后，将菌体悬浮在等体积的 LB 培养基中，然后按 1%（*V*/*V*）的接种量接种到无抗生素的 LB 液体培养基中，37℃、12r/min 培养 6h。其后每 6h 转接入新的同型摇瓶，接种量为 1%（体积分数），新摇瓶的装液量和培养条件不变。如此重复培养 15 次，然后通过梯度稀释涂布于 LB 平板和含红霉素的 LB 平板上，在荧光照射下，观察计数，计算质粒的保存率，确定质粒在受体菌内的稳定性。

短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对不同作物枯萎病病原菌的抑菌作用：挑取短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 和短短芽胞杆菌 JK-2 菌株单菌落于 LB 液体培养基中培养 48h 后，将预先制备好的 PDA 固体培养基加热熔化，待其冷却至 50℃左右时，分别加入上述的滤液各 4ml，充分摇匀后平均倒入两块培养皿，制成培养基平板，以加 4ml 无菌水 PDA 平板作空白对照。待培养基凝固后，用直径 6mm 的打孔器从长势旺盛的尖孢镰刀菌平板上取菌饼，并各移一块菌饼至上述制备的平板中央，每处理重复 2 次。将各处理及对照放置在 28℃恒温箱内培养，于处理后的 8d，用“＋”字形测量法测量镰刀菌的菌落直径，计算抑菌率，

抑菌率=[（CK 菌落直径−6）-（供试菌落直径−6）]/（CK 菌落直径−6）×100%。

2. 短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 GFP 转化子荧光检测

转化子在选择性培养基上的菌落为圆形，与原始菌株相同（图 3-36～图 3-39），在立体荧光显微镜下观察，整个菌落发出绿色荧光（图 3-36）。在荧光显微镜下（激发光波长 480nm，发射光波长 520nm），短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 菌体形状与原始菌株一样（图 3-37 和图 3-38），均为短杆状，单个、直线形排列或聚集成团，发绿色荧光。

3. 短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 GFP 转化子生长特性

短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 菌株的生长曲线实验结果见图 3-40。短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的生长起始时期为培养的 0～6h，菌株生长起始期生长缓慢，培养 6h 后，标记菌株进入对数生长时期，菌株生长迅速，直至培养 10h 后，开始进入稳定生长时期，生长开始趋于平缓。短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的遗传稳定性在无选择压力条件下，对短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 在指数期以 1%接种量连续转接 15 次，相当于连续传代培养 100 代后，在非选择性 LB 平板和选择性 LB 平板（含 Em）培养后，将平板在荧光显微镜下观察，发现在非选择性平板上大部分菌落仍可发出绿色荧光，短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对绿色荧光蛋白标记的丢失率为 11.7%。

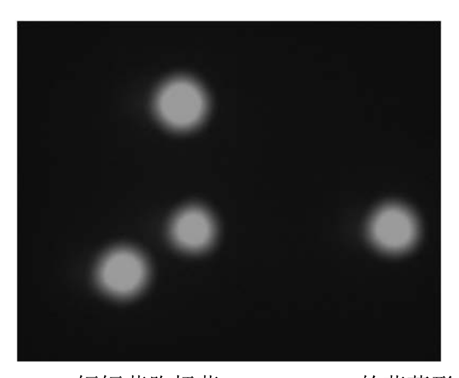


图 3-36　短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的菌落形态

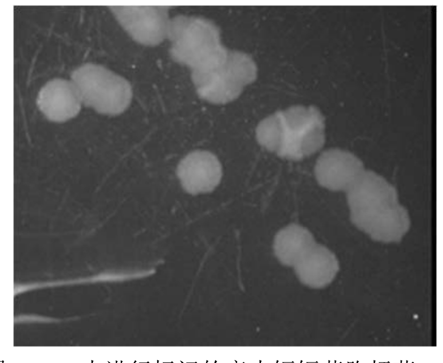


图 3-37　未进行标记的亲本短短芽胞杆菌 JK-2

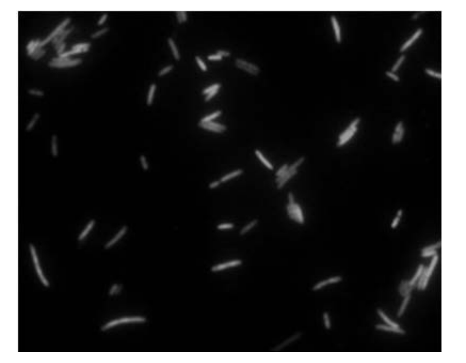


图 3-38　短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的菌体形态

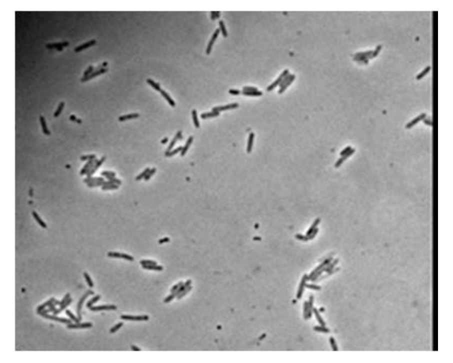


图 3-39　野生型的短短芽胞杆菌 JK-2

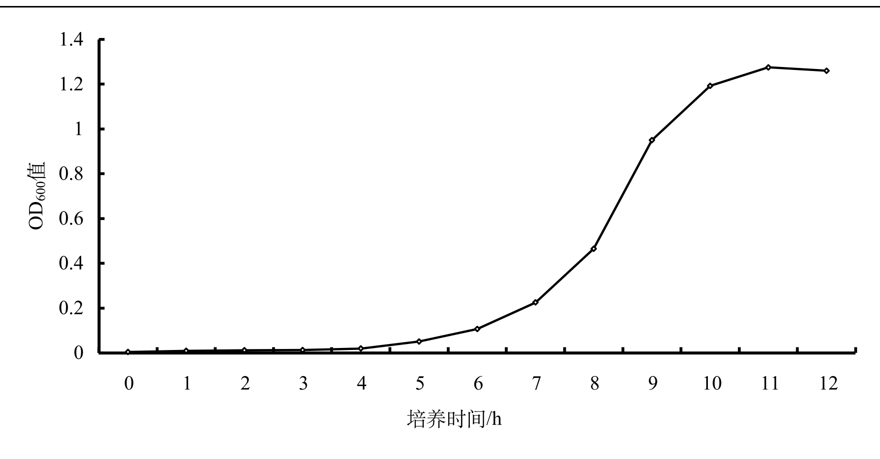


图 3-40　短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 的生长曲线

4. 短短芽胞杆菌 GFP 转化子对枯萎病病原菌的抑菌作用

实验结果见表 3-9。短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对香蕉枯萎病病原菌菌株 370 具有抑菌作用，抑菌率为 95.24%，而野生型的 JK-2 菌株的抑菌率为 94.05%；短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对黄瓜 121 和甜瓜 129 枯萎病病原菌菌株的抑菌同未标记前的野生型菌株 JK-2 的抑菌率相同，二者的抑菌率均为 98.81%；对西瓜枯萎病病原菌菌株 136 的抑菌率为 92.75%，略低于野生型菌株 JK-2 的抑菌率。

表 3-9　短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对不同植物枯萎病病原菌的抑菌率　　（单位：%）

菌种编号	尖孢镰刀菌 370	尖孢镰刀菌 121	尖孢镰刀菌 129	尖孢镰刀菌 136	平均值
原菌株 JK-2	94.05	98.81	98.81	93.49	95.38
转化子 JK-2:pCM20	95.24	98.81	98.81	92.75	96.16

短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对不同植物枯萎病病原菌具有很强的抑菌能力，平均抑菌率为 95.38%，与野生型菌株 JK-2 的抑菌率 96.16%相差不大，说明 *gfp* 基因的标记并未影响枯萎病短短芽胞杆菌 JK-2:pCM20 对不同植物枯萎病病原菌的抑菌能力。

5. 讨论

作为分子标记物，GFP 标记技术只有十几年的历史，但如今已有越来越多的研究人员将其作为快速高效的研究工具（Bhatia *et al.*，2002；Unge *et al.*，1999）。GFP 由于具有独特的分子结构、简单的发光机理、稳定的化学性质、能在活体细胞内表达和检测方便等优点而明显优于目前世界上已采用的 *lac*、*gus*、*neo*、*lux* 等标记基因技术，利用激光共聚焦显微镜可以对其直观地进行实时监测，为更好地进行目标菌株的观察追踪奠定了基础（Unge and Jansson，2001）。

植物土传病害生防菌株的作用机制包括拮抗、竞争及诱导的系统抗性（ISR），这些机制都要求生防菌株在引入的位点能稳定存活定殖（Bloemberg *et al.*，1997）。采用 *gfp*

标记的菌株可以不使用选择性平板筛选，直接在荧光显微镜下即可观察到有绿色荧光发出的标记细菌，从而减小了分离菌量与实际定殖菌量的差异。范晓静等（2008）通过构建 pS4GFP，将其导入具有内生、防病、促生作用的野生型枯草芽胞杆菌 BS-2 中，筛选获得遗传稳定性好且具有良好发光表型的标记菌株 BS-2-gfp。该标记菌株在小白菜体内的定殖研究结果表明，该菌株能够在小白菜根际及根、茎、叶内定殖和传导，接菌 50d 后仍能在其体内分离到标记菌株。本实验成功地获得了具 *gfp* 标记和红霉素抗性标记的转化子 JK-2:pCM20。该转化子绿色荧光强度很强，并且连续转接 15 次后，JK-2:pCM20 对绿色荧光蛋白标记的丢失率为 11.7%，说明 *gfp* 基因在该菌中能够稳定地表达，这一结果与刘芳和梁云祥（2005）的荧光稳定性检测结果相同，其研究结果表明，经连续稀释传代和在无抗性压力选择情况下，*gfp* 基因在枯草芽胞杆菌 B412 中能获得稳定表达。

用质粒进行菌株标记时，由于质粒上的报道基因和抗生素等基因的表达是在宿主菌体的复制、转录、翻译系统作用下进行的，消耗了宿主的物质和能量，会给宿主造成代谢负担，这就有可能影响宿主菌的拮抗性能，因此确保采用 *gfp* 基因标记后的生防菌的拮抗性能对于研究其生防机理至关重要（田涛和王琦，2005）。枯萎病生防菌 JK-2:pCM20 对不同寄主植株枯萎病病原菌具有很强的抑菌能力，平均抑菌率为 95.38%，与野生型菌株 JK-2 的抑菌率 96.16%相差不大，说明 *gfp* 基因标记前后未改变其对枯萎病的生防效果，这与贾艳华（2005）的研究结果相同，她在采用红色荧光蛋白基因标记荧光假单胞菌进行的室内平板抑菌实验结果表明，*rfp* 标记菌株 8’P303、12P303 与出发菌 P303 的抑菌活性相当，都对烟草赤星青霉、黄瓜炭疽、油菜立枯、萝卜褐腐等多种真菌有较强的抑制作用。在本实验中，作者还发现标记后的生防菌 JK-2:pCM20 和野生型菌株对不同寄主植株枯萎病病原菌的抑菌率有所不同，对瓜类作物的枯萎病病原菌的抑菌能力高于对香蕉枯萎病病原菌的抑菌能力。对不同瓜类作物的枯萎病病原菌的抑菌能力也有所不同，标记后的生防菌 JK-2:pCM20 和野生型菌株对黄瓜和甜瓜枯萎病病原菌的抑菌能力明显高于对西瓜枯萎病病原菌的抑菌能力。枯萎病生防菌的成功标记，为进行生防菌的动态监测提供了直观的研究手段，为进行生防菌防病机理的研究奠定了基础。

三、苏云金芽胞杆菌绿色荧光蛋白基因的转导

1. 概述

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）是由 Morise 等在 1974 年从水母（*Aequorea victoria*）中提纯。GFP 在不同种属原核、真核细胞中不需额外加入辅助因子即可成熟为有活性的 GFP，因此既可以作为荧光标记物监测活体细胞中基因表达，也可以作为体外实验中有用的工具。这些发现使 GFP 作为基因标记物或融合蛋白标记在动物、植物、微生物研究中广泛应用。王爱民和高霞莉（2009）通过根癌农杆菌介导的方法，将绿色荧光蛋白基因导入水稻的胚性愈伤组织中，获得转基因的再生植株，并稳定表达。车建美等（2008）将 *gfp* 和 *luxAB* 融合基因成功转入青枯雷尔氏菌，融合基因在标记菌株中的表达高效稳定，并且导入的基因对宿主的生长特性及致病性没有影响。苏洁等（2007）用绿色荧光蛋白基因（GFP）标记大肠杆菌菌株 K12，并检测其在海水中的存

活及稳定性。研究利用 *gfp* 基因标记苏云金芽胞杆菌，获得基因稳定表达、特性稳定的发光标记菌株，为进一步研究其防病机理奠定基础。试验方法如下。①菌株和质粒：苏云金芽胞杆菌突变株 BtHD73 由福建农林大学提供，质粒 pCM20 中带有 *gfp* 基因。②质粒的提取：从含 150μg/ml 红霉素的 LB 平板中挑取新鲜培养的在荧光显微镜下发绿色荧光的质粒宿主菌的单菌落，于 100ml 含 150μg/ml 红霉素的 LB 液体培养基中，37℃条件下振荡培养 16～18h 后，进行质粒提取，质粒提取及纯化步骤按 QIAGEN 质粒大量提取试剂盒提供的方法进行，采用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的质粒，上样量为 2μl。③苏云金芽胞杆菌突变株 BtHD73 电击转化：在预冷的 0.2mm 电转化杯中分别加入质粒 DNA 与 100μl 感受态细胞混合，冰浴 10min 后，进行电击转化，然后迅速加入 LB 液体培养基，30℃、150r/min 振荡培养 2h，取 200μl 涂布于含有 10μg/ml 红霉素的 LB 固体培养基上，30℃培养。④阳性转化子的荧光检测及荧光显微检测：阳性转化子的荧光检测参照文献，通过观察菌落发出的绿色荧光直接筛选阳性转化子，取少量处于对数生长期的细胞，涂布在载玻片上，制片后在荧光显微镜下检测荧光，并观察菌体的细胞形态。

2. 苏云金芽胞杆菌 BtHD73 *gfp* 基因转导

研究成功地采用 *gfp* 基因标记了苏云金芽胞杆菌突变菌株 BtHD73，得到绿色荧光蛋白基因标记的苏云金芽胞杆菌突变株 BtHD73，在荧光显微镜下观察转化后菌株的细胞形态，发现标记后的菌体呈短杆状，整个细胞呈现绿色荧光（图 3-41，图 3-42），说明已经将 *gfp* 基因成功转入苏云金芽胞杆菌突变菌株 BtHD73。在 LB 培养基平板上苏云金芽胞杆菌突变株 BtHD73 与原始菌株生长菌落形态完全一致，引入的新质粒不影响菌株的基本特性。

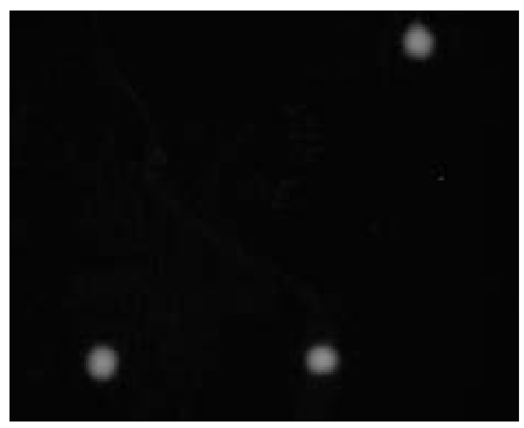


图 3-41　GFP 标记苏云金芽胞杆菌突变菌株 BtHD73 菌落形态（1）

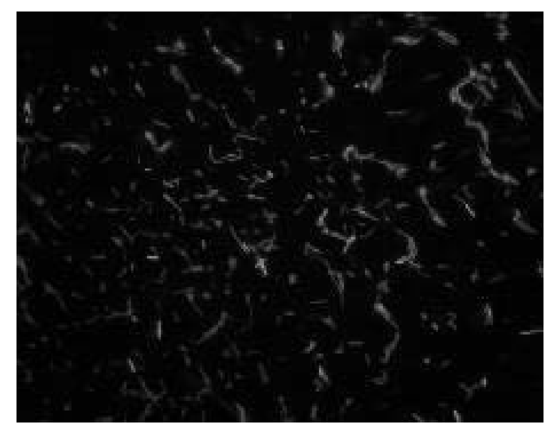


图 3-42　GFP 标记苏云金芽胞杆菌突变菌株 BtHD73 菌体形态（2）

第七节　短短芽胞杆菌全基因组测序

一、概述

短短芽胞杆菌是一类革兰氏染色阳性或可变、菌体杆状、产芽胞、以周生鞭毛运动且具有较强蛋白质分泌能力的一类细菌（邱孙全等，2009）。芽胞杆菌是土壤和植物微生态的优势微生物群，具有很强的抗逆能力和抗菌防病能力，适用于制备生防菌剂（高芬等，2006）。

短短芽胞杆菌是具有广谱抗菌活性的一种生防菌，该菌能以活体形式寄居到大量的真菌植物病原体中，包括灰葡萄孢（*Botrytis cinerea*）、苍耳单丝壳菌（*Sphaerotheca fuliginea*）及终极腐霉（*Pythium ultimum*），并且可以通过分泌抗菌代谢物短杆菌肽 S（gramicidin S）来抑制真菌或细菌的生长（侯仲轲和毛春晖，2000）。短短芽胞杆菌能产生多种活性物质，对 G^+菌和一些病原真菌都具有显著的杀伤作用（Kittelbergerl *et al.*，1999）。陈莉等（2008）筛选到一株对棉花立枯病菌、枯萎病菌和黄萎病菌都具有拮抗作用的短短芽胞杆菌 A57，初步研究表明在其中起主要作用的是拮抗蛋白或者小分子肽类物质。

短短芽胞杆菌 JK-2 是本实验室从土壤中分离得到的一株芽胞杆菌（郑雪芳等，2006），研究表明它对西瓜枯萎病菌、大丽轮枝菌、苦瓜炭疽病菌、桃褐腐病菌、番茄青枯雷尔氏菌、禽致病性大肠杆菌菌株 K88 都具有强的抑制作用，是一株具有广谱抗菌活性的生防菌（葛慈斌等，2009）。短短芽胞杆菌 JK-2 至少可产生两种不同的抑菌活性物质，主要通过拮抗作用来抑制枯萎病菌的侵染（郝晓娟等，2007）。短短芽胞杆菌 JK-2 的发酵液对龙眼果实腐生菌（车建美等，2010）、植物病原菌（葛慈斌等，2009；黄素芳等，2010）和动物病原菌（陈璐等，2009）均具有较好的抑制效果。当前仅有一株短短芽胞杆菌 NBRC 100599 已获得全基因组序列，本节对短短芽胞杆菌 JK-2 进行全基因组测序及比较分析，可以从基因组的角度阐述该菌株的抑菌机理，从而指导短短芽胞杆菌基因组功能的研究。芽胞杆菌全基因组测序研究方法如下。

二、研究方法

1. 菌株的获得

本实验室从西瓜根际土壤中分离得到短短芽胞杆菌菌株 JK-2。将生长的新鲜短短芽胞杆菌 JK-2 单菌落于 20ml NA 液体培养基中，于 28～30℃、180r/min 振荡培养 16～18h 后进行基因组 DNA 的提取。将短短芽胞杆菌发酵液在 12 000r/min 离心 10min 后进行基因组 DNA 的提取。短短芽胞杆菌基因组 DNA 提取按照 Promega 试剂盒要求步骤进行。DNA 提取后，采用 1%琼脂糖进行电泳，上样量为 2μl。将所提取的 DNA 进行稀释，测定 OD_{260}、OD_{280} 和 OD_{230} 值，检测所提取 DNA 的纯度。

2. 高通量测序

采用新一代测序技术 Iillumina-Solexa 对短短芽胞杆菌 JK-2 进行深度测序，测序仪器为 Illumina GA IIx，测序读段长度（read length）100bp，构建一种末端配对（PE）文库，文库的插入序列平均长度为 400bp，PE 读段数 3 699 796，共测得碱基 739 959 200bp，测序深度达 10^8×（表 3-10）。

表 3-10　短短芽胞杆菌 Solexa 测序详情

菌株	读段长度	末端配对长度	末端配对读段数	总数据	深度
JK-2	100bp	400bp	3 699 796	739 959 200 bp	10^8×

3. *de novo* 拼接和读段定位

对短短芽胞杆菌 J 菌株 K-2 的 Solexa 测序原始数据进行处理，经过质量剪切和校正，利用新一代测序拼接工具 SOAPdenovo（Li *et al.*，2009），基于图论（de Bruijn graph）的方法对短短芽胞杆菌 JK-2 进行 *de novo* 拼接，从而获得短短芽胞杆菌 JK-2 基因组框架图（scaffold）。利用 Bowtie（Langmead *et al.*，2009）将读段定位至框架图上，采用“-v 2”模式，即允许 2 个错配，保存为 SAM 格式（参数“-S”）。利用 SAMTools（Li and Chun，2009）处理 SAM 文件，并利用 BEDTools（Quinlan and Hall，2010）的 genomeCoverageBed 程序计算 per-base coverage，即单碱基覆盖率（参数“-d”）。计算框架图的总覆盖深度和各个 scaffold 的覆盖深度。利用 SAMTools 的 mpileup 生成 pileup 文件，pileup 格式说明详见 SAMTools 网站上的说明：http：//samtools.sourceforge.net/pileup.shtml。通过 perl 语言编程来处理 pileup 文件，从 pileup 文件中列出所有差异位点（读段与参照序列之间有错配）。并对这些差异位点进行 SNP 过滤。本节设定的 SNP 过滤阈值为：差异位点的 per base coverage 在 30 以上，500 以下，错配次数（绝对数量）在 5 次以上（包括 5 次），SNP 频率大于等于 2%。对不符合 SNP 筛选条件的错配当做测序错误，错配数进行累积，从而计算测序错误率。测序的错误率为所有测序错误碱基数除以所有定位读段的总碱基数。

4. 基因预测与注释

本文利用原核生物基因预测软件 Prodigal（Hyatt *et al.*，2010）在短短芽胞杆菌 JK-2 基因组框架图上预测编码基因。通过同源比对识别 rRNA，利用 ARAGORN（Laslett and Canback，2004）预测 tRNA。在 UNIREF（http：//www.uniprot.org/help/uniref）、NR（http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/）及细菌基因组 refseq（http：//www.ncbi. nlm.nih.gov/RefSeq/）数据库中搜索最相似的同源基因。同时进行酶（EC）（http：//enzyme.expasy.org/）、代谢途径（KO）（http：//www.genome.jp/kegg/ko.html）、功能分类（COG）（http：//www.ncbi. nlm.nih.gov/COG/）注释。

5. 比较基因组学研究

对短短芽胞杆菌 NBR100599 已完成全基因组测序，在 NCBI BioProject 上搜索 NBR100599 的基因组信息，在 JGI IMG 上的编号为 643692011，从该网站下载该菌株的基因组序列、所有 CDS 及蛋白质的序列，以及基因组的特征信息等。网址为 http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/29147。

1）双向最佳比对和直系同源基因，在全基因组水平上，对短短芽胞杆菌 NBR100599 和 JK-2 的蛋白质序列进行双向最佳比对（bidirectional best hit，BBH 或 reciprocal best hit，RBH），从而鉴定得到这两个物种之间的直系同源基因（orthologous genes）。利用 Blast+ 的 Blastp（Camacho *et al.*，2007）程序进行双向比对，只选择比对分值最高的最佳匹配项，并要求序列比对相似性在 30%以上，比对双方中较短的那条序列的全长，联配长度需占其 60%以上，期望值在 0.001 以上。分别将各自的直系同源基因从全基因组蛋白质序列文件中提取出来，其他未获得双向最佳匹配的基因也另存为一个文件。后者向前者进行最佳比对，以寻找旁系同源基因，设定过滤参数，要求序列比对相似性在 50%以上，比对双方中较短的那条序列的全长，联配长度需占其 70%以上，期望值在 0.001 以上。如未能找到旁系同源基因，则说明这些基因属于菌株特异基因。

2）全基因组比对（megaBlast）和基因组岛，短短芽胞杆菌 JK-2 和 NBR100599 的全基因组核酸序列进行 megaBlast 比对，比对结果筛选条件如下：选择联配长度大于 200bp，或者在比对双方中，联配长度需占较短的那条序列全长的 80%以上；分别按照 query 和 subject 的顺序进行排序。从排序后的比对结果中，perl 编程识别各自未能匹配的基因组片段，这些序列就是各自菌株的基因组岛（genome island），是该菌株中所特有的，而在比对菌株中不存在的基因组片段，通过基因组岛分析可以得知两个菌株之间基因组成分的差异。

三、基因组 DNA 浓度测定

经琼脂糖电泳检测，所提取的 5 管短短芽胞杆菌 JK-2 基因组 DNA 电泳条带整齐清晰，无拖尾现象，可以用于基因组 DNA 的测序（图 3-43）。优质的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.7～2.0。经检测，所提取的 5 管短短芽胞杆菌 JK-2 基因组 DNA 浓度较高，OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8～2.0，说明所提取的基因组 DNA 符合测序要求。

四、基因组框架图质控统计

短短芽胞杆菌 JK-2 经过 SOAPdenovo 拼接共得到 72 个大于 500bp 的框架序列（scaffold），总长达 6Mb。从表 3-11 可知，scaffold 的平均长度为 83.6kb，最长的 scaffold 长度达 606kb；N50 值为 180kb，N50 数量为 9 个，N90 值为 47.3kb，N90 数量为 33 个。在短短芽胞杆菌 JK-2 基因组框架图中重叠群（contig）的数量比 scaffold 数量多一个，因此，短短芽胞杆菌 JK-2 基因组框架图中仅含有一个逻辑 Gap，碱基 N 仅有 25 个，重叠群的各项质控统计详见表 3-11。对短短芽胞杆菌 JK-2 的 scaffold 和 contig 序列进行质控统计，结果显示拼接效果较为理想，基本达成基因组框架图的发布要求。

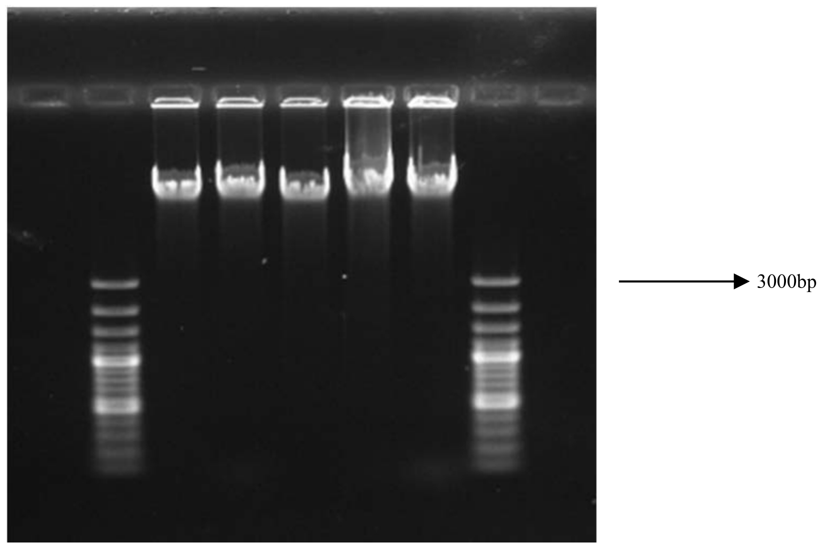


图 3-43　短短芽胞杆菌基因组 DNA 电泳图谱

表 3-11　短短芽胞杆菌 JK-2 的质控统计

项目	框架序列	重叠群
数量	72	73
长度/bp	6 020 700	6 020 675
最大长度/bp	606 502	606 502
平均长度/bp	83 620.8	82 475.0
N50 数量	9	9
N50 长度/bp	180 663	180 663
N90 数量	33	33
N90 长度/bp	47 266	47 266

根据读段定位，计算框架图的总覆盖深度为 98.77×，各个 scaffold 的 coverage 主要分布于 62×～135×。Coverage 最大值为 1431×，该 scaffold 长度仅为 2kb 左右。不满足 SNP 过滤条件的错配属于测序错误，从而评估 solexa 测序的错误率。计算得到短短芽胞杆菌 JK-2 的测序错误率为 0.38%，并且在菌株 JK-2 中共检测到 3075 个 SNP，SNP 密度为 0.511/kb，SNP 频率均值为 7.56%。

五、基因组特征概述

全基因组序列已知的短短芽胞杆菌 NBR100599 基因组规模约为 6.3Mb，GC 含量为 47.27%，共有 5947 个编码基因，基因密度达 87.07%，CDS 平均长度为 922bp，另外，在菌株 NBR100599 中共有 15 个 rRNA 操纵子，127 个 tRNA。短短芽胞杆菌 JK-2 的基因组规模为 6Mb，预测得到 5677 个基因，平均长度为 933bp，基因密度达 87.83%，基

因组的GC含量为47.30%。从表3-12的结果可知，短短芽胞杆菌NBR100599和菌株JK-2的基因组特征基本一致。此外，菌株JK-2核糖体rRNA操纵子预测得到一个，因为是重复序列，拼接和预测不完整；tRNA预测得到80个。

表3-12　短短芽胞杆菌的基因组概述

菌株	基因组大小/bp	GC含量/%	CDS数量	基因密度/%	CDS平均长度/bp	rRNA操纵子	tRNA数量
NBR100599	6 296 436	47.27	5947	87.07	922	15	127
JK-2	6 020 700	47.30	5677	87.83	933	1	80

六、基因组注释

通过和NR、UNIREF以及Bacterial refseq进行同源比对，短短芽胞杆菌JK-2的5666个预测基因中，有264个基因注释为假定蛋白质，表示功能未知，有1921个基因注释为假定未知功能蛋白质，这两类基因占了总数的38.56%，还有61.44%的基因，其功能可以通过同源比对获得。

短短芽胞杆菌JK-2的5666个预测基因与这3个数据库进行比对，核酸序列的一致性为21.76%～100%，均值为91%。此外，共有943个基因可以匹配至EC（酶）数据库，包含EC的注释；有2048个基因有KO（代谢途径基因功能分类）的注释；有3826个基因有COG（直系同源基因聚类簇，基因功能分类）的注释。值得注意的是，部分假定未知功能蛋白质也可以有COG或者KO注释的。

将72个scaffold序列连接在一起，按scaffold的序列长度进行降序排列，中间插入100个N，构成基因组草图（unsorted），scaffold在基因组中的真实位置，尚不能排定（图3-44）。最外一层圆环，有灰度变化的，表示每10kb碱基序列的基因密度，白色表示基因密度在60%以下，密度越高颜色越深，这一圈可表示编码序列在基因组草图中的分布。中间一层圆环是所有基因在草图中的定位，红色表示与scaffold相同顺序，蓝色表示反向互补。最内层定位了1556个注释基因，这些基因含有明确的基因名称，功能注释较为详细。

七、直系同源基因

菌株JK-2和菌株NBRC 100599都属短短芽胞杆菌，通过比较发现，两者共有5013个直系同源基因（图3-45），平均氨基酸一致性（AAI）达97.1%。短短芽胞杆菌JK-2含有非直系同源基因665个，菌株NBRC 100599含有非直系同源基因935个。

通过旁系同源基因的比较分析，在菌株JK-2中发现47个旁系同源基因，在菌株NBRC 100599中发现83个旁系同源基因。其余既不是直系同源基因，也不是旁系同源基因，在菌株JK-2和菌株NBRC 100599中分别还有618个和852个，这些基因属于菌株特异基因（strain-specific gene），分别占基因总数量的10.89%和14.33%。新测序的菌株JK-2中这618个基因需要进行深入研究分析。

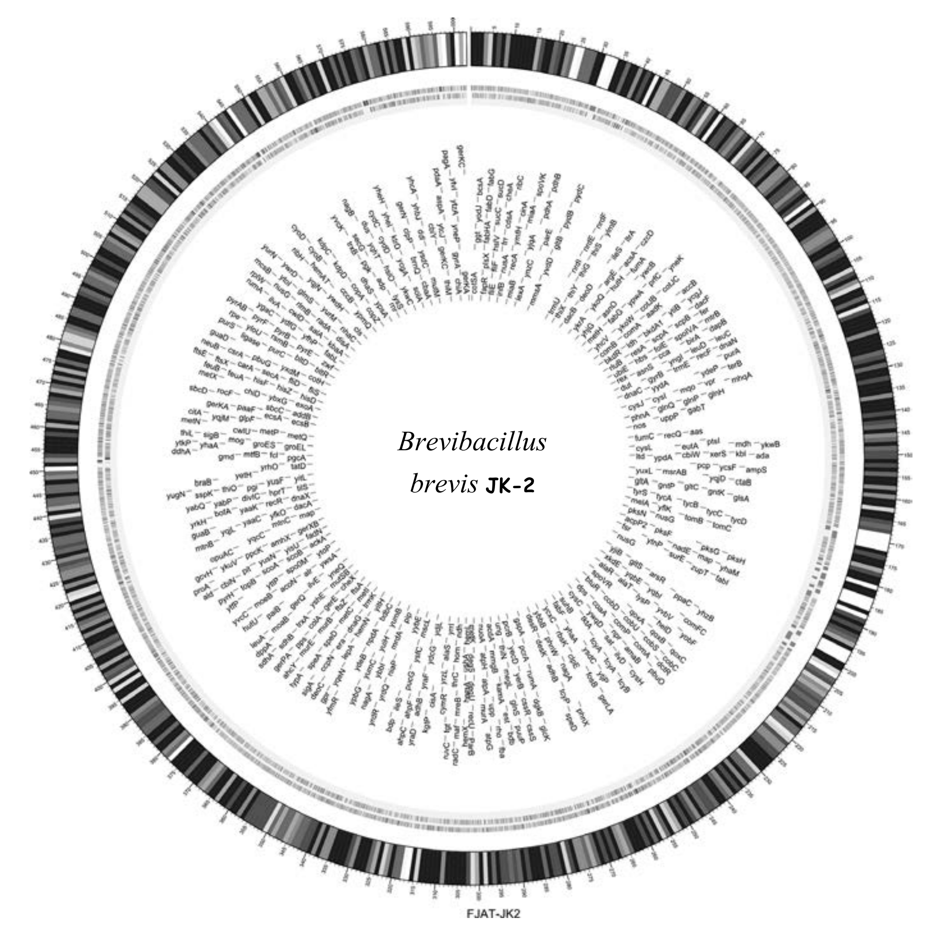


图 3-44　短短芽胞杆菌 JK-2 的基因组草图

最外层黑白条码表示 10kb 扫描窗口的基因密度，白色表示基因密度在 60%以下，颜色越深表示基因密度越高；中间层表示所有预测基因的位置，其中红色表示基因不完整（partial，fragment），即缺少起始密码子或终止密码子，蓝色表示基因达全长（complete，full length）；最内层，将具有基因名（symbol name）的基因按其位置标识在图中

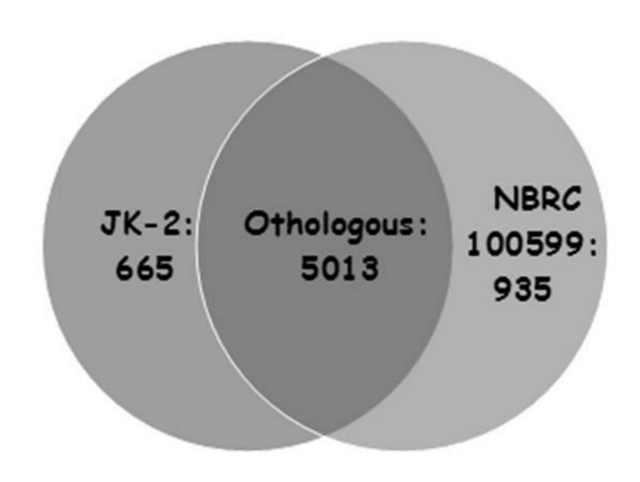


图 3-45　短短芽胞杆菌 JK-2 和菌株 NBRC 100599 的直系同源基因

八、基因组岛

在全基因组水平上，通过 megaBlast 比对发现短短芽胞杆菌 JK-2 和菌株 NBRC 100599 的基因组岛（genome island）。从表 3-13 可知，在菌株 JK-2 中共有 100 个大于 1000bp 的基因组岛，总计 525 282bp，约占基因组全长的 8.72%；而在菌株 NBRC 100599 中，共发现 161 个大于 1kb 的基因组岛，共计 709 506bp，占总量的 11.27%。其中，在 JK-2 中最长的基因组岛有 97kb，在菌株 NBRC 100599 中，有 67kb。说明短短芽胞杆菌 JK-2 和菌株 NBRC 100599 的基因组成分具有一定的差异，这些基因组岛内的菌株特异基因需要做进一步研究。

表 3-13　短短芽胞杆菌的基因组岛

项目	JK-2	NBRC 100599
基因岛数量	100	161
基因岛长度/bp	525 282	709 506
基因组大小/bp	6 020 700	6 296 436
比例/%	8.72	11.27
最大基因岛长度/bp	97 931	67 383

九、讨论

目前已完成全基因组测序的短短芽胞杆菌仅有一株，为短短芽胞杆菌 NBRC 100599。新测序的短短芽胞杆菌 JK-2 同该菌株进行比较发现分析，短短芽胞杆菌 JK-2 中有 618 个菌株特异基因，主要分布在 100 个基因岛上，这些基因的功能还有待于进一步的分析。菌株 JK-2 和菌株 NBRC 100599 基因组之间具有 10%左右的差异，差异的来源及引起的基因组结构变异还需要做深入分析。

通过 Solexa 深度测序，发现仅菌株 JK-2 自身存在一定的点突变，检测到的 SNP（单核苷酸多态性）在基因组中的密度达 0.511/kb，SNP 频率均值达 7.56%，说明菌株 JK-2 群落中会自发地产生一定程度的变异，这可能与菌株 JK-2 的世代进化较快有关。

另外，在短短芽胞杆菌 JK-2 的 5677 个预测基因中，有 38.56%的基因功能未知，有待于做进一步注释和功能研究。对短短芽胞杆菌的全基因组测序可从基因组水平上为该菌株抑菌机理研究和相关产品的开发应用奠定基础，大大提高研究开发的科学性和效率。

第四章 芽胞杆菌生态学特性

第一节 微生物生态学原理与方法

一、概述

微生物生态学是研究微生物群体（微生物区系或正常菌群）与其周围的生物和非生物环境条件间相互作用规律的学科。在地球上，微生物无处不在，在整个生物圈中都可发现。除非最为极端的环境，它们在酸性湖泊、深海、冰冻区和热泉口都能够生存。随着研究的不断深入，微生物在全球物质能量循环中起到的作用被越来越多地认识到，对微生物生态学的研究将对气候、环境研究起到至关重要的作用。

生态一词源于希腊文，其意为住所或栖息地。生态学（ecology）一词由德国学者Haeckel（1866）提出，他认为：生态学是研究生物有机体与其无机环境之间相互关系的科学。ecology一词源于希腊文，由词根“oiko”和“logos”演化而来，“oikos”表示住所，“logos”表示学问。因此，从原意上讲，生态学是研究生物“住所”的科学。不同学者对生态学有不同的定义。英国生态学家Elton（1927）的定义是“科学的自然历史”；澳大利亚生态学家Andrewartha和Birch（1954）认为，生态学是研究有机体的分布与多度的科学，强调了对种群动态的研究；美国生态学家 Odum（1971）的定义是研究生态系统的结构与功能的科学；我国著名生态学家马世骏认为，生态学是研究生命系统和环境系统相互作用的科学，但生态学发展至今，其内涵和外延关系都有了变化，生态学的定义不能局限于当初经典的含义，结合近代生态学发展动向，归纳各种观点，可将生态学定义为：生态学是研究生物生存条件、生物及其群体与环境相互作用的过程及其相互规律的科学，其目的是指导人与生物圈（即自然、资源与环境）的协调发展。

生态学发展的萌芽期，古人在长期的农牧渔猎生产中积累了朴素的生态学知识，如作物生长与季节气候及土壤水分的关系、常见动物的物候习性等。例如，公元前4世纪希腊学者亚里士多德曾粗略地描述动物的不同类型的栖居地，还按动物活动的环境类型将其分为陆栖和水栖两类，按其食性分为肉食、草食、杂食和特殊食性等。亚里士多德的学生、公元前3世纪的雅典学派首领赛奥夫拉斯图斯在其《植物地理学》著作中已提出类似今日植物群落的概念。公元前后出现的介绍农牧渔猎知识的专著，如古罗马公元1世纪老普林尼的《博物志》、6世纪中国农学家贾思勰的《齐民要求》等均记述了朴素的生态学观点。生态学形成期从15世纪到20世纪40年代。15世纪以后，许多科学家通过科学考察积累了不少宏观生态学资料。19 世纪初叶，现代生态学的轮廓开始出现，如雷奥米尔的6卷《昆虫学》著作中就有许多昆虫生态学方面的记述。瑞典博物学家林奈首先把物候学、生态学和地理学观点结合起来，综合描述外界环境条件对动物和植物的影响。

法国博物学家布丰强调生物变异基于环境的影响。德国植物地理学家洪堡创造性地结合气候与地理因子的影响来描述物种的分布规律。19 世纪，生态学进一步发展。一方面是由于农牧业的发展促使人们开展了环境因子对作物和家畜生理影响的实验研究。另一方面，马尔萨斯于 1798 年发表的《人口论》一书造成了广泛的影响。费尔许尔斯特于 1833 年以其著名的逻辑斯谛曲线描述人口增长速度与人口密度的关系，把数学分析方法引入到生态学。19 世纪后期开展的对植物群落的定量描述已经以统计学原理为基础。1851 年，达尔文在《物种起源》一书中提出自然选择学说，强调生物进化是生物与环境交互作用的产物，引起了人们对生物与环境的相互关系的重视，更促进了生态学的发展。

19 世纪中叶到 20 世纪初叶，人类所关心的农业、渔业和直接与人类健康有关的环境卫生等问题，推动了农业生态学、野生动物种群生态学和媒介昆虫传病行为的研究。由于当时组织的远洋考察人员重视对生物资源的调查，从而丰富了水生生物学和水域生态学的内容。到 20 世纪 30 年代，已有不少生态学著作和教科书阐述了一些生态学的基本概念和论点，如食物链、生态位、生物量、生态系统等。至此，生态学已基本成为具有特定研究对象、研究方法和理论体系的独立学科。20 世纪 50 年代以来，生态学吸收了数学、物理、化学工程技术科学的研究成果，向精确定量方向前进并形成了自己的理论体系，数理化方法、精密灵敏的仪器和电子计算机的应用，使生态学工作者有可能更广泛、深入地探索生物与环境之间相互作用的物质基础。

由于世界上的生态系统大都受人类活动的影响，社会经济生产系统与生态系统相互交织，形成了庞大的复合系统。随着社会经济和现代工业化的高速发展，自然资源、人口、粮食和环境等一系列影响社会生产和生活的问题日益突出。为了寻找解决这些问题的科学依据和有效措施，国际生物科学联合会（IUBS）制定了“国际生物学计划”（IBP），对陆地和水域生物群系进行生态学研究。1972 年，联合国教育、科学及文化组织等继 IBP 之后，设立了人与生物圈（MAB）国际组织，制定“人与生物圈”规划，组织各参加国开展森林、草原、海洋、湖泊等生态系统与人类活动关系，以及与农业、城市、污染等有关的科学研究。许多国家都设立了生态学和环境科学的研究机构。和许多自然科学一样，生态学的发展趋势是：由定性研究趋向定量研究，由静态描述趋向动态分析；逐渐向多层次的综合研究发展；与其他某些学科的交叉研究日益显著。由人类活动对环境的影响来看，生态学是自然科学与社会科学的交汇点；在方法学方面，研究环境因素的作用机制离不开生理学方法，离不开物理学和化学技术，而且群体调查和系统分析更离不开数学的方法和技术；在理论方面，生态系统的代谢和自稳态等概念基本是引自生理学，而由物质流、能量流和信息流的角度来研究生物与环境的相互作用则可以说是物理学、化学、生理学、生态学和社会经济学等共同作用。

二、微生物生态学研究范畴

微生物生态学与医学、工业、农业、环境保护和社会科学均有密切的关系。相关研究还将有助于解释生物基因进化、基因和酶的代谢调控及生物适应环境的机理等问题，对于保护微生物资源和多样性具有重要意义。

微生物生态学研究范畴包括：①研究微生物生态学所用的传统和现代分子生物学方

法；②在正常自然环境中的微生物种类、分布及其随着不同环境条件的变化而发生的变化规律；③在极端自然环境中的微生物种类和它们所起的作用，在极端环境中微生物的生命机理；④在自然界中微生物之间的相互关系，微生物与动植物之间的相互关系，这些相互关系对自然界的影响和环境因素对这些相互关系的影响；⑤在正常自然环境中，微生物代谢活动对自然界的影响，环境条件的变化对这些代谢活动的影响；⑥污染环境中的微生物学等。

微生物生态学研究范畴还包括了微生物的分类阶元，种类组成，种群分布，群落结构，生态功能，数量动态，空间分布，影响因素，因子作用，信号传递，遗传变异，进化演替等。由于环境中只有很小比例的微生物能够在培养基中分离，目前分子生物学方法被普遍采用，即分子生态学。随着卫星遥感技术的发展，人造卫星照片可以帮助研究人员监测全球性的微生物发展变化，提供更准确的信息，如水华的产生。

三、微生物生态学研究内容

1. 微生物生态学

微生物生态学（Microbial ecology）是研究微生物与环境之间相互作用的科学，是生态学的一个分支。所谓环境是指微生物赖以生存的空间，由非生物环境和生物环境两大部分组成。非生物环境是除微生物以外的环境，由一系列物理、化学、生物因素所构成，如温度、水分、光线、pH、天敌等，是生物生存的场所。生物因素是指来自研究对象以外的其他生物的作用和影响，如营养竞争、空间竞争和互利共生等。微生物生态学的研究起步较晚。与动植物相比，微生物个体微小，种群数量庞大，因此，微观性和群体性成为微生物生态学研究的显著特点。正是这些特点，给微生物生态学研究在技术上带来了较大困难，这是微生物生态学一直落后于动植物生态学的主要原因。

2. 微生物生态系统

生态系统（Ecosystem）是指在一定区域内生活的生物与其非生物环境之间相互紧密结合而形成的系统。在这个系统中，物质、能量在生物与生物、生物与环境之间不断循环流动，形成一个能够自我维持、相对稳定的，并具有一定独立性的统一整体。生态系统的范围和大小相差悬殊。

3. 微生物生物圈

生物圈（Biosphere）构成一个范围最大的生态系统。它是地球表面全部生物及与之相关的自然环境的总称，包括水生物圈（Hydrosphere）、地上岩石生物圈（Lithosphere）、大气生物圈（Atmosphere）。由于水土和大气中只有出现生物后才能构成生物圈，因此，生物圈的范围大致可以说是地球外壳 34km（即 23km 的高空加 11km 深的海沟）。在这一范围内，微生物与自然环境之间相互作用、相互渗透，产生巨大的生物地球化学变化。

4. 微生物生物系统

微生物生物循环中包含有许多大小不等的生态系统，大的如绵绵数亿平方米的森林生态系统，而小的可以是一个湖泊或是一口池塘。在水域生态系统（Aquatic ecosystem）如淡水湖中，微生物是生产者（Producer）。在晴天时，表层水光线充足，蓝细菌和绿藻利用阳光和二氧化碳进行光合作用产生碳水化合物。消费者（Consumer）如动物和人则利用光合作用中产生的生物量作为食物。当它们死亡时，细菌和浮游生物等分解者（Decomposer）将有机物分解为简单的组成单元，供给水生植物所需要的营养物质。由此可见，生物就是这样与环境结合在一起，彼此之间相互依赖，形成一个有组织的完整生态系统。相对而言，微生物生物圈只不过是完整生态系统的一个组成部分，但对完整生态系统的功能有着不可忽视的重要影响。

四、微生物种群生态学

1. 微生物种群的概念

在自然环境中，同种微生物的许多个体（Individual）常生活在同一生境中，以群体的方式存在。在一定时间里生活在同一生境的同一个体细胞生长形成的微生物群体，在生态学上称为种群，它是由同代细胞经过连续的有丝分裂而形成的相似个体所组成。一个种群通常生活在一定的范围内，并占据着一定空间。生态学上，把一个种群生活的环境称为该种群的栖息地（Habitat），或称为生境。在一定空间范围内同时生活着同种个体的集群，如柑橘、水稻、茶叶、番茄等植株体内的特定芽胞杆菌种群。

种群（Population）一词源于拉丁语 *Populus*，原意为人群，后在生物学中推广至一切物种，译为种群，另外还有居群、繁群等译名。种群是占据某一区域的某个种的个体总和（Friederich *et al.*，1930）。当用 Population 一词专指种群数量时，则视具体物种的不同而有人口、兽口、虫口、微生物种群等名称。种群是微生物物种在自然界中存在的基本单位，又是微生物群落的基本组成单位，它是一种特殊组合，具有独特的性质、结构、功能，有自动调节大小的能力。

微生物种群内部的遗传过程是微生物种群遗传学（现通常译为微生物群体遗传学）的研究主题。微生物种群成员间及它们与环境之间的相互作用则为微生物种群生态学的中心内容。这两者共同构成微生物种群生物学。在理论上，种群研究与进化机制的探讨密切相关；在实用上，人口控制、生物资源利用及有害生物防治等问题实质上都是种群问题。因此，种群研究日益受到各方面的重视。种群生态学 （Population ecology）是研究同种（微）生物个体种群数量动态、特性分化及其发生发展的科学。

2. 微生物种群的特征

微生物种群（Microbial population）是在同一时期内占有一定空间的同种微生物个体的集合。自然种群具有 3 个特征：①空间特征，微生物种群具有一定的分布区域和分存形式；②数量特征，每单位面积（或空间）上的微生物个体数量（即密度）将随时间而

发生变动；③遗传特征，微生物种群具有一定的基因组成，即是一个基因库，以区别于其他物种，但基因组成是处于变动之中的。

微生物种群特征是指同种微生物结成群体之后才出现的特征，因此，大部分是数量特征。正因如此，在微生物种群研究中常需要借助统计学。关于种群的大小及密度，对界限明显的种群可以统计整体。但对一般种群则常测定其密度，即单位面积或体积中的个体数量。在种群生态学中研究种群的物质代谢及种群与自然环境的交互作用时，主要是从密度着眼。但在群体遗传学中研究各种遗传性状在种群中的分布及其变迁时，必须考虑互相杂交繁育的整个种群。

3. 微生物种群的密度

微生物种群密度在生产生活中有重要作用，种群密度常用取样方法进行统计与估算，取样以样方的“随机性-等可能”为原则，排除人为因素。样方法取样适合微生物调查，如大肠杆菌、芽胞杆菌、假单胞菌、病原引起的植物病害症状等的取样调查。取样的操作过程是：在调查范围内，随机选取若干个完全相等的样方，统计微生物症状或分离微生物，统计数量，计算每个样方的个体数，并求出每个样方的种群密度，再求出所有样方种群密度的均值和方差，以此值作为被调查种群的种群密度的估算值。常见的取样方法有“等距取样法”、“五点取样法”、“Z 字取样法”、“对角线取样法”和“棋盘式取样法”等（图 4-1）。

除极少数微生物种群引起的动植物病征的特征易于观察外，对大多数微生物种群都不必完全计数。因此常采用抽样方法加以估计。对于静止的微生物如大肠杆菌、芽胞杆菌、植物病原菌等，可选取一些具有代表性的区域——样方，计录一定面积或体积中的特征计数单元，如发病株数、单位芽胞杆菌数量、单位特征微生物脂肪酸标记数量等，再根据样方在总面积或体积中的比例推算出总体数量。为了选取具代表性的样方，还需要先初步了解该物种在空间中的分布类型：均匀型，聚集型，还是随机型。对于活动的微生物，根据需要还可采用另一类抽样方法，如标记重捕法。对第一次采集到的微生物（第一次样本）标记（绿色荧光蛋白）后释放，经过一段时间估计标记微生物已在总体中均匀分布后，再次采集并计数其中标记微生物所占比例，根据第一样本数目（原标记数）及第二次样本中的标记比例即可推出总体数目。上述这些方法得出的都是绝对数量，但有时绝对数量难以得到，则可以调查数量的相对变动（或增加或减少）。这时也可以只测量一些间接的指标，如土壤酶变化、土壤呼吸量变化、土壤总体脂肪酸变化等，可粗略估计某种微生物的数量增减。

以微生物发酵床垫料微生物种群调查为例，调查细菌、真菌、放线菌种群数量。采集地点为渔溪部队农场，即福建省省农业科学院现代农业示范基地微生物发酵床养猪场，取样的猪舍面积为 15m×66m=990m^2，纵向分 10 栏，横向分 3 栏，共 30 个样点，采用棋盘式取样法，每个采样点直径约 40cm，将垫料上下翻匀，采集 2kg 发酵床垫层，取样待用。调查工作 15 天一次，共 5 次，采样的图形见图 4-2。

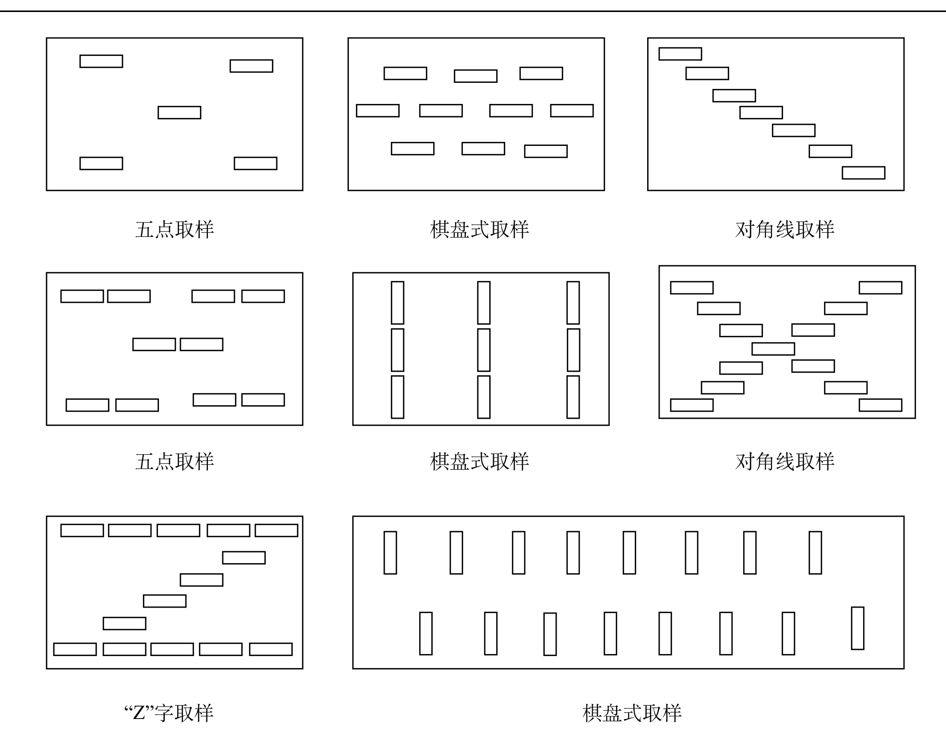


图 4-1　常见的取样方法

<table>
<tr><td>10 栏</td><td>9 栏</td><td>8 栏</td><td>7 栏</td><td>6 栏</td><td>5 栏</td><td>4 栏</td><td>3 栏</td><td>2 栏</td><td>1 栏</td><td rowspan="7">过道</td></tr>
<tr><td colspan="10">饮水处</td></tr>
<tr><td>30</td><td>27</td><td>24</td><td>21</td><td>18</td><td>15</td><td>12</td><td>9</td><td>6</td><td>3</td></tr>
<tr><td>29</td><td>26</td><td>23</td><td>20</td><td>17</td><td>14</td><td>11</td><td>8</td><td>5</td><td>2</td></tr>
<tr><td>28</td><td>25</td><td>22</td><td>19</td><td>16</td><td>13</td><td>10</td><td>7</td><td>4</td><td>1</td></tr>
<tr><td colspan="10">取食台</td></tr>
<tr><td colspan="10">过道</td></tr>
</table>

图 4-2　猪舍概貌及取样栏舍位点示意

微生物含量分析：称取 10g 样品至装有 90ml 无菌水的三角瓶，摇床振荡 15min，即配成 10^{-1} 浓度，吸取 1ml 原液至装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-2} 浓度，依次稀释配置不同浓度，吸取 200μl 至相应标记浓度的平板上，涂布均匀。每个梯度重复 3 次，将涂好的平板用报纸包好倒置于恒温箱中培养。细菌 30℃，1～2d；真菌 25℃，2～6d；放线菌 28℃，5～7d；根据菌落的形态特征如大小、色泽、边缘状态及表面干湿等进行分类统计。结果计算：每克样品中微生物的数量＝同一稀释度的 3 个平板上菌落平均数 × 稀释倍数×5/含菌样品克数。

分析结果见表 4-1。根据细菌、真菌、放线菌的形态学特征记录平板培养分离结果并进行统计分析。从表中可以看出，在培养统计的含量数据里，总的来说，细菌>放线菌>真菌。3 类微生物的数量分布，细菌平均值为（33.72～197.23）$\times10^{5}$CFU/g，真菌平均值

为（26.45～48.64）×10^3CFU/g，放线菌平均值为（20.14～28.46）×10^4 CFU/g。细菌数量变化最大，其次是真菌，放线菌相对比较稳定。

表 4-1　微生物发酵床垫料微生物数量统计

时间	细菌含量/（×10^5CFU/g）			真菌含量/（×10^3CFU/g）			放线菌含量/（×10^4CFU/g）		
/d	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值	平均值
1	70.25	5.23	33.72	102.51	1.05	34.33	78.01	3.51	27.93
15	164.75	8.25	54.35	192.52	1.05	48.64	73.10	11.01	28.46
30	655.00	13.50	139.33	277.53	2.75	37.17	122.10	1.75	33.18
45	1930.00	13.00	197.23	162.54	1.51	26.45	83.20	0.71	20.14
60	602.50	10.10	79.40	80.05	0.75	7.87	85.03	3.45	24.43

4. 微生物种群的组成

同种微生物虽具有相似性，但其具体遗传性状在个体中有差异。同种微生物共有的大量基因决定了它们的相似性。此外还有很多基因在个体间是不同的，这些基因和每个微生物面对的不同环境因子共同决定了它们之间的差异。微生物发酵床垫料微生物种群组成调查见表 4-2，从表中可知，垫料内的微生物主要由细菌、真菌、放线菌组成，其中，细菌数量最大，达 504.03×10^5CFU/g，真菌数量仅为细菌 1/3 强，放线菌的数量与真菌相近。

表 4-2　微生物发酵床垫料微生物种群组成

项目	细菌含量/（×10^5CFU/g）	真菌含量/(×10^3CFU/g)	放线菌含量/(×10^4CFU/g)
调查平均值总和	504.03	154.46	134.14

5. 微生物种群的数量动态

微生物种群的大小总在不断变动着，这决定于两组数字的消长：微生物种群可以因繁殖而增长，也可因死亡而减少。因生死造成的变化常称为自然增减。对于相对隔离的种群，其增减主要取决于繁殖率与死亡率的对比。繁殖率、死亡率是研究种群动态的主要参数。在理想环境中（理化条件适宜、资源丰富、空间无限、无天敌相扰），一个物种能达的繁殖率称为最大繁殖率或生理繁殖率，其数值为一常数，较为固定。

在实际环境中达的繁殖率则称为实际繁殖率或生态繁殖率，其数值因具体条件而异。由于环境的限制，任何微生物也不能在自然条件下实现其最大繁殖率，而微生物的种群常随天气的波动而发生大幅度的增减。但一些较大的生物（动物、植物）的种群大小可在较长的时期内保持相对稳定，这说明存在自动调节的机制。从理论上讲，当种群密度增加时，死亡率也相应增加或繁殖率相应降低，或两种情况同时出现，这都可以使种群密度维持稳定。这种因密度而变的因子称为密度制约因子。死亡率常是密度制约的，例

如，营养有限、个体多时只有强者竞争得食而存活，弱者则竞争失败受饥而死亡，因而死亡率随密度增加。这时繁殖率的下降也可能是密度制约的，因为当营养缺乏时，繁殖率也常随之下降。

对微生物发酵床养猪垫料每 15d 取样一次，分离统计细菌、真菌、放线菌种群数量，种群数量变化动态见图 4-3。在 60d 的调查中，细菌数量变化较大，随着时间进程，细菌种群数量逐步增加，到 45d 达高峰，而后有所下降；真菌和放线菌种群数量波动不大，保持相对稳定。

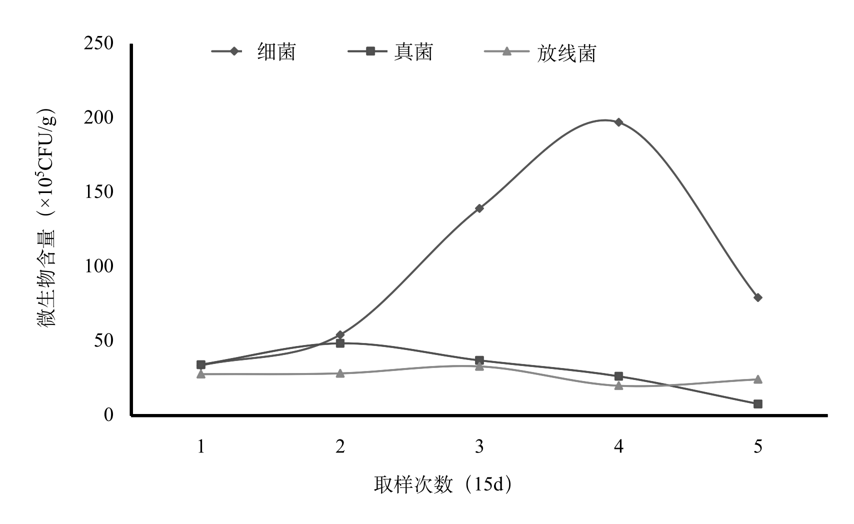


图 4-3　微生物发酵床垫料微生物种群动态

6. 微生物种群的空间分布

由于自然环境的多样性，以及种内种间个体之间的竞争，每一种群在一定空间中都会呈现出特有的分布形式。空间分布（spatial distribution）是表示生物个体在空间上的分配状态，是一种空间上的统计概念。微生物种群的空间分布因种类和发育阶段的差异而不同，还受种群密度的大小、环境因素等影响。了解空间分布的差异，可以认识某种微生物的生活习性和对环境的适应性。

以微生物发酵床养猪垫料细菌种群空间分布格局分析为例，将各采样点细菌含量的高低可以分为 3 类：细菌含量大于 70×10^5CFU/g 属于高含量组，在空间分布格局上用黑色表示，细菌含量为（30～70）$\times10^5$CFU/g 为中含量组，用灰色表示，细菌含量小于 30×10^5CFU/g 为低含量组，用无色表示。

第 1 天采样（图 4-4），微生物发酵床垫料细菌空间分布格局分析：高含量组包括 1 个位点，4 栏的位 10，细菌数量为 70.25×10^5CFU/g；中含量组包括 16 个位点，1 栏的位 1、位 2 和位 3，2 栏的位 4，5 栏的位 13，位 14 和位 15，6 栏的位 17 和位 18，7 栏的位 21，8 栏的位 22 和 24，9 栏的位 26 及 10 栏的 3 个位点，细菌数量为（30～60）$\times10^5$CFU/g；其余 13 个位点属于低含量组，细菌数量低于 30×10^5CFU/g，最低位是 6 栏的位 16，细

菌数量为 5.53×10^{5}CFU/g。

	10栏	9栏	8栏	7栏	6栏	5栏	4栏	3栏	2栏	1栏	
过道	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	过道
	29	26	23	20	17	14	11	8	5	2	
	28	25	22	19	16	13	10	7	4	1	

图 4-4　第 1 天采样细菌空间分布

第 15 天采样（图 4-5），微生物发酵床垫料细菌空间分布格局分析：高含量组包括 10 个位点，1 栏的位 1 和位 2，2 栏的位 4 和位 5，7 栏的位 19，8 栏的位 22、位 23 和位 24，9 栏的位 25 及 10 栏的位 29，最高为 2 栏的位 5，细菌数量为 164.75×10^{5}CFU/g；中含量组包括 13 个位点，1 栏的位 3、3 栏的位 7 和位 9、4 栏的位 10 和位 11、5 栏的位 14、6 栏位 16 和位 18、7 栏的位 20 和位 21、9 栏的位 26、位 27 及 10 栏的位 28，细菌数量为（30.5～69.5）×10^{5}CFU/g；其余 7 个位点属于低含量组，细菌数量低于 29.5×10^{5}CFU/g，最低位是 5 栏位 15，细菌数量为 8.25×10^{5}CFU/g。

	10栏	9栏	8栏	7栏	6栏	5栏	4栏	3栏	2栏	1栏	
过道	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	过道
	29	26	23	20	17	14	11	8	5	2	
	28	25	22	19	16	13	10	7	4	1	

图 4-5　第 15 天采样细菌空间分布

第 30 天采样（图 4-6），微生物发酵床垫料细菌空间分布格局分析：高含量组包括 11 个位点，1 栏的位 1 和位 2，3 栏的位 7，4 栏的位 10，5 栏位 13 和位 14，8 栏位 22 和位 24，9 栏的位 25 及 10 栏的位 28 和位 30，细菌数量为（70.5～865）×10^{5}CFU/g 之间，最高 4 栏的位 10，细菌数量为 865×10^{5}CFU/g；中含量组包括 13 个位点，1 栏位 3，2 栏位 4 和位 5，3 栏位 8 和位 9，4 栏位 12，5 栏的位 15，6 栏的位 17，7 栏的位 20 和位 21，8 栏的位 23，9 栏的位 26 和位 27，细菌数量为（34.5～66.5）×10^{5}CFU/g；其余 6 个位点属于低含量组，低于 28.25×10^{5}CFU/g，最低位是 6 栏的位 18，细菌数量为 8.25×10^{5}CFU/g。

第 45 天采样（图 4-7），微生物发酵床垫料细菌空间分布格局分析：高含量组包括 15 个位点，1 栏位 1，5 栏的位 13，6 栏的位 16 和位 18，7 栏的位 19、位 20 和位 21、8 栏的位 22、位 23 和位 24，9 栏的位 26 和位 27 及 10 栏的位 28、位 29 和位 30，细菌数量大于 84×10^{5}CFU/g，最高为 1 栏的位 1，为 1930×10^{5}CFU/g；中含量组包括 6 个位点，

1 栏的位 2、2 栏的位 5、3 栏的位 7 和位 9、4 栏的位 12、9 栏的位 25，细菌数量为（32～64.75）×10^5CFU/g；其余 9 个位点属于低含量组，细菌数量低于 32×10^5CFU/g，最低位是 5 栏的位 14，细菌数量为 13×10^5CFU/g。

	10 栏	9 栏	8 栏	7 栏	6 栏	5 栏	4 栏	3 栏	2 栏	1 栏	
过道	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	过道
	29	26	23	20	17	14	11	8	5	2	
	28	25	22	19	16	13	10	7	4	1	

图 4-6　第 30 天采样细菌空间分布

	10 栏	9 栏	8 栏	7 栏	6 栏	5 栏	4 栏	3 栏	2 栏	1 栏	
过道	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	过道
	29	26	23	20	17	14	11	8	5	2	
	28	25	22	19	16	13	10	7	4	1	

图 4-7　第 45 天采样细菌空间分布

第 60 天采样（图 4-8），微生物发酵床垫料细菌空间分布格局分析：高含量组包括 9 个位点，1 栏的位 2 和位 3，2 栏的位 4 和位 6，8 栏的位 23，9 栏的位 27 及 10 栏的位 28、位 29 和位 30，细菌数量高于 79×10^5CFU/g，最高为 1 栏的位 3，细菌数量为 602.5×10^5CFU/g；中含量组包括 13 个位点，1 栏的位 1，2 栏的位 5，3 栏的位 7、位 8 和位 9，4 栏的位 12，5 栏的位 13、位 14 和位 15，7 栏的位 19、8 栏的位 22、位 24 及 9 栏的位 26，细菌数量为（38.25～68）×10^5CFU/g；其余 8 个位点属于低含量组，细菌数量低于 29.25×10^5CFU/g，最低位是 4 栏的位 11，细菌数量为 10.1×10^5CFU/g。

	10 栏	9 栏	8 栏	7 栏	6 栏	5 栏	4 栏	3 栏	2 栏	1 栏	
过道	30	27	24	21	18	15	12	9	6	3	过道
	29	26	23	20	17	14	11	8	5	2	
	28	25	22	19	16	13	10	7	4	1	

图 4-8　第 60 天采样细菌空间分布

一般来说，种群分布的状态和形式，可分为 3 种类型：①随机的；②均匀的；③聚集的。研究生物种群空间分布型的聚集度指标有多种，如平均拥挤度 m^*、m^*/m、C_A、

负二项分布中的 K 指标等，这些指标还可以为种群行为、种群扩散的时间序列变化等提供信息。本研究采用负二项分布中的 K 指标，在负二项分布中，$K=\bar{x}^2/(S^2-\bar{x})$，当 $K<0$ 时为均匀分布；当 $K\to+\infty$ 时为随机分布，在实际应用中，$K>2$ 时视为随机分布；当 $K>0$ 时为聚集分布。

利用上述公式，计算出微生物发酵床垫料中细菌、真菌、放线菌的负二项分布中的公共 K 值变化曲线见图 4-9。细菌和放线菌在取样的前 30d，K 值变化比较大，表明细菌和放线菌在取样的前 30d 种群空间分布为随机分布，而后 K 值逐次下降，细菌和真菌 K 值降幅分别为 29.9%和 87.1%，之后趋于稳定，表明细菌和放线菌在取样 30d 后，空间分布为聚集分布。真菌在整个取样过程，K 值都小于 2，表明其分布为聚集分布，聚集程度随取样时间逐步增加，K 值曲线变化比较平缓，表明真菌聚集分布的程度变化比较平缓，聚集分布程度比较稳定。

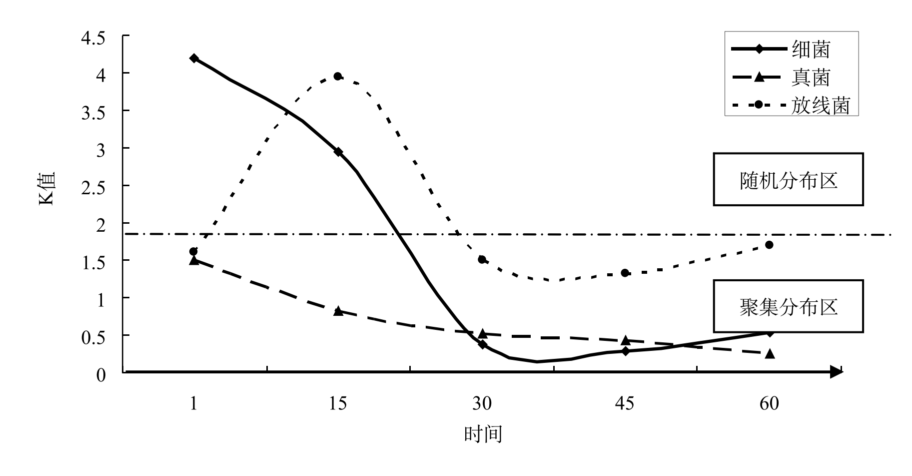


图 4-9　微生物发酵床垫料微生物种群负二项分布中的公共 K 值变化曲线

细菌、真菌和放线菌在微生物发酵床基质垫层中的分布均为聚集分布形式，细菌和放线菌在前 3 次的聚集程度变化比较大，之后趋于稳定，真菌整体变化比较平缓，在 3 类微生物的聚集程度比较稳定的状态下，真菌的聚集分布程度高于细菌和放线菌。

7. 微生物种群的生长模型

密度制约性微生物种群增长为逻辑斯谛方程。在资源有限的空间中生长的一个简单种群，其增长可简单地描述成“S”形曲线。在早期阶段，资源丰富，死亡率最小，繁殖尽可能快，使个体达其内禀增长率。种群以几何指数增长，直到达上限时才结束。上限或饱和值在特定生境、特定条件下是恒定的，称为环境容纳量（carrying capacity）（K）。当种群更加拥挤时，增长率下降为零，种群大小稳定，为环境所能承受的最大值，达平衡的种群密度。密度制约的发生，导致内禀增长率（r）随密度增加而降低，这与 r 保持不变的非密度制约性的情况相反。S 曲线可以解释并描述为非密度制约增长方程乘上一个密度制约因子，就得到逻辑斯谛方程 （Logistic equation）。

以蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 种群生长模型为例，将斜面保藏菌种接种到新鲜斜面

培养基上，经 30℃活化培养，然后挑一环制成菌悬液，经同步处理后，按 5%接种量接种到 250ml 三角锥瓶装液 30ml，(30±1)℃振荡培养，设 3 个重复，摇床转速 200r/min，12h 取样一次，测定发酵液的 pH、OD 值、菌体数、含糖量、含氮量。OD 值的测定将发酵液稀释 10 倍，利用分光光度计测其在波长 650nm 处的 OD 值。菌体数的测定将发酵液稀释 100 倍，利用血球计数板测定其菌体数。糖分含量的测定：参照杨中汉等的 3,5-二硝基水杨酸法进行，先将发酵液用 3mol/dm^3 HCl 水解，然后用 NaOH 溶液调 pH 至稍大于 7.0，定容，离心，取上清液来测定。测定结果见表 4-3。

表 4-3　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 摇床培养参数测定

发酵周期/h	pH	OD_{650} 值	总糖量/%	菌体数/($\times10^8$CFU/ml)
0	7.0	0.56	1.230	—
12	7.2	0.68	0.667	6.72
24	7.8	0.85	0.679	9.40
36	8.0	1.05	0.677	38.8
48	8.2	1.10	0.725	44.2
60	8.5	0.95	0.735	46.2
84	8.5	0.85	—	36.4

注：“—”表示无数据

用 Logistic 方程对菌体生长量进行拟合（0～60h）（表 4-4）。菌体数量从 12h 开始增加，菌体数达 6.72×10^8CFU/ml，而后增长速度逐渐增加，60h 达高峰，Logistic 方程如下：

$$N=\frac{K}{1+e^{a-rt}} \tag{4-1}$$

式中，N 为菌体量；K 为最大负荷量；α 为常数；r 为增长率；t 为时间。

K 的估计：

$$K=\frac{2\times N_1\times N_2\times N_3-N_2^2\times\left(N_1+N_3\right)}{N_1\times N_3-N_2^2} \tag{4-2}$$

从表 4-4 中，取 3 个点，N_1=6.72，N_2=38.8，N_3=46.2，代入上述方程，计算结果 K=46.51。

由公式（4-1）

得 $N(1+e^{a-rt})=K$

即 $(K-N)/N=e^{a-rt}$

取对数 $\ln(K-N)/N=a-rt$，

令 $y=\ln(K-N)/N$

即有 $y=a-rt$

用最小二乘法求 α 和 r。计算过程如下：

得 $y=4.0829-0.1490t$　（R=0.9822）

则 $N=\dfrac{46.51}{1+e^{4.0829-0.1490t}}$

表明蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 在该条件下，增长率 r=0.1490。

表 4-4　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098 菌体生长拟合计算

发酵周期/h	菌体数/（$\times10^8$CFU/ml）	（K-N）/N	ln（K-N）/N
0	1.00	—	—
12	6.72	5.9211	1.7785
24	9.40	3.9478	1.3731
36	38.8	0.1987	−1.6159
48	44.2	0.0522	−2.9514
60	46.2	0.0067	−5.0041
84	36.4	—	—

注：“—”表示无数据

五、微生物群落生态学

1. 微生物群落的概念

在自然界中，一个微生物种群的细胞很少是单独存在的，它们总是与其他种群细胞相联系，构成一个在生理上相互弥补的种群复合体，称为群落（community）。例如，在湖泊微生物生态系统中，能量以日光、有机碳或还原无机物的形式进入生态系统。以二氧化碳作为主要碳源进行生长的微生物，统称为自养型微生物。以有机物而不是以二氧化碳作为主要碳源或唯一碳源，以无机或有机氮化合物作为氮源进行生长的微生物，统称为异养型微生物。自养型微生物利用光能合成新的有机物质，异养型微生物含有碳、氢、磷、硫、铁和许多其他元素。这些所合成的物质，以及外界进入生态系统的有机物和还原无机物质，控制着化能有机营养生物和化能无机营养生物的代谢活动。不同种类的微生物在同一生态环境中生存，利用不同的资源，形成微生物群落。

环境中微生物的群落结构及多样性和微生物的功能及代谢机理是微生物生态学的研究热点。长期以来，由于受到技术限制，人们对微生物群落结构和多样性的认识还不全面，对微生物功能及代谢机理方面了解也很少。但随着高通量测序、基因芯片等新技术的不断更新，微生物分子生态学的研究方法和研究途径也在不断变化。第二代高通量测序技术（尤其是 Roche 454 高通量测序技术）的成熟和普及，使人们能够对环境微生物进行深度测序，灵敏地探测出环境微生物群落结构随外界环境的改变而发生的极其微弱的变化，对于研究微生物与环境的关系、环境治理和微生物资源的利用及人类医疗健康有着重要的理论和现实意义。微生物群落多样性的研究涉及农业、土壤、林业、海洋、矿井、人体医学等诸多领域。

2. 群落的数量特征

①物种丰富度（species richness）。物种丰富度是指群落所包含的物种数目，是研究群落首先应该了解的问题。②密度与多度。群落内各物种的个体数量即多度；D（密度）=N（样地内某物种的个体数）/S（样地面积）。物种多度分布是群落中物种个体数的频率分布，与群落结构有关，最早也拿来作为物种多样性的测度。③频度。频度是指某物种在样本总体中的出现率。F（频度）=n_i（某物种出现的样本数）/N（样本总数）×100%。④盖度。盖度是植物群落学的一个术语。植物枝叶所覆盖的土地面积称为投影盖度，简称盖度。同样的概念可以移到微生物群落盖度的测定。⑤优势度与重要值。优势度是确定微生物种类在群落中生态重要性的指标，优势度大的微生物种类就是群落中的优势种。确定微生物优势度时，指标主要是种的盖度和密度。动物一般以个体数或相对多度来表示。同样的概念可以移到微生物群落优势度与重要值的测定。测定公式：I（重要值）=[相对密度（%）+相对频度（%）+相对显著度（%）]/300。

3. 群落的综合特征

①存在度（presence）和恒有度（constancy）。在同一类型的群落中，某一种生物所存在的群落数即为存在度。各个群落中的物种，可按其出现的次数比率划分出存在度等级。通常 20%为一级，共分为 5 级。存在度大的种类越多，则各群落的相似程度越大。某物种在各个具有相同面积的群落出现的次数称为恒有度。恒有度可以避免由于取样面积不等而造成的参差不齐。同样的概念可以移到微生物群落存在度和恒有度的测定。②确限度。确限度用以表示某一个种局限于某一类型植物群落的程度。Braun-Blanquet 根据植物种类对群落类型的确限程度，归并为 5 个确限度等级。特征种：确限度为 5，只见于或几乎只见于某一群落类型的物种；偏宜种：确限度为 4，最常见于某一群落，但也偶见于其他群落的物种；适宜种：确限度为 3，在若干群落中能或多或少丰盛地生长，但在某一群落中占优势或多度大的种。伴随种：确限度为 2，不固定在某一群落内的种。偶见种：确限度为 1，少见及偶见而从别的群落迁入的种，或过去群落残遗下来的种。确限度愈大的种就是最好的特征种，它能作为一定群落类型如群丛的标志。同样的概念可以移到微生物群落确限度的测定。③群落相似性系数。群落相似性系数是指各样方单位共有种的百分率，其计算方法很多，目前不下十几种。Jaccard 相似性系数是目前最为基础和常用的相似性系数之一，其公式为：群落系数=$c/(a+b-c)$。式中，a 为样方 A 的物种数；b 为样方 B 的物种数；c 为样方 A 和 B 中的共有种数。

4. 群落的时间结构

如果说植物种类组成在空间上的配置构成了群落的垂直结构和水平结构，那么不同植物种类的生命活动在时间上的差异，就导致了结构部分在时间上的相互配置，形成了群落的时间结构。在某一时期，某些植物种类在群落生命活动中起主要作用；而在另一时期，则是另一些植物种类在群落生命活动中起主要作用。同样的概念可以移到微生物群落时间结构的分析。

5. 群落的垂直结构

大多数群落的内部都有垂直分化现象，即不同的生物种出现于地面以上不同的高度和地面以下不同的深度，从而使整个群落在垂直方向上有上下层次的出现，即成层现象。群落的垂直结构主要就是指成层现象。同样的概念可以移到微生物群落垂直结构的分析。

6. 影响群落结构的因素

1）生物因素：①竞争。如果竞争引起种间的生态位的分化，将使群落中物种多样性增加。②捕食。如果捕食者喜食的是群落中的优势种，则捕食可以提高多样性，如果捕食者喜食的是竞争上占劣势的种类，则捕食会降低多样性。

2）干扰：在陆地生物群落中，干扰往往会使群落形成断层（gap），断层对于群落物种多样性的维持和持续发展，起了一个很重要的作用。不同程度的干扰，对群落的物种多样性的影响是不同的，Connell（1978）提出的中等干扰说（intermediate disturbance hypothesis）认为，群落在中等程度的干扰水平下能维持高多样性。其理由是：①在一次干扰后少数先锋种入侵断层，如果干扰频繁，则先锋种不能发展到演替中期，使多样性较低；②如果干扰间隔时间长，使演替能够发展到顶级期，则多样性也不很高；③只有在中等程度的干扰，才能使群落多样性维持最高水平，它允许更多物种入侵和定居。

3）空间异质性：环境的空间异质性，环境的空间异质性越高，群落多样性也越高。植物群落的空间异质性、植物群落的层次和结构越复杂，群落多样性也就越高。例如，森林群落的层次越多、越复杂，群落中鸟类的多样性就会越多。同样的概念可以移到影响微生物群落结构因素的分析。

7. 群落的多样性

物种多样性是群落生物组成结构的重要指标，它不仅可以反映群落组织化水平，而且可以通过结构与功能的关系间接反映群落功能的特点。生物群落多样性研究始于 20 世纪初叶，当时的工作主要集中于群落中物种面积关系的探讨和物种多度关系的研究。1943 年，Williams 在研究鳞翅目昆虫物种多样性时，首次提出了“多样性指数”的概念，之后大量有关群落物种多样性的概念、原理及测度方法的论文和专著被发表，形成大量的物种多样性指数，一度给群落多样性的测度造成了一定混乱。自 20 世纪 70 年代以后，Whittaker（1972）、Pielou（1975）、Washington（1984）和 Magurran（1988）等对生物群落多样性测度方法进行了比较全面的综述，对这一领域的发展起到了积极的推动作用。从目前来看，生物群落的物种多样性指数可分为 α 多样性指数、β 多样性指数和 γ 多样性指数 3 类。

8. 多样性的测度方法

微生物多样性测定主要有三个空间尺度：α 多样性，β 多样性，γ 多样性。

1）α 多样性指数主要关注局域均匀生境下的物种数目，因此也被称为生境内的多样性（within-habitat diversity）。

2）指沿环境梯度不同生境群落之间物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率也被称为生境间的多样性（between-habitat diversity），控制β多样性的主要生态因子有土壤、地貌及干扰等。不同群落或某环境梯度上不同点之间的共有种越少，β多样性越大。精确地测定β多样性具有重要的意义。这是因为：①它可以指示生境被物种隔离的程度；②β多样性的测定值可以用来比较不同地段的生境多样性；③β多样性与α多样性一起构成了总体多样性或一定地段的生物异质性。

3）γ多样性描述区域或大陆尺度的多样性，是指区域或大陆尺度的物种数量，也被称为区域多样性（regional diversity）。控制γ多样性的生态过程主要为水热动态，气候和物种形成及演化的历史。γ多样性主要指标为物种数（S），测定沿海拔梯度具有两种分布格局：偏锋分布和显著的负相关格局。多样性指数是反映丰富度和均匀度的综合指标。应指出的是，应用多样性指数时，具低丰富度和高均匀度的群落与具高丰富度与低均匀度的群落，可能得到相同的多样性指数。

（1）α多样性指数

1）Gleason均匀度指数（Gleason，1922），指群落中各个种的相对密度，即物种均匀度。公式 $D=S/\ln A$，式中，A 为单位面积，S 为群落中的物种数目。

2）丰富度指数（Margalef，1961），指一个群落或环境中物种数目的多寡,亦表示生物群聚（或样品）中种类丰富度程度的指数，公式 $D'=(S-1)/\mathrm{Ln}N$，式中，S 为群落中的总数目；N 为观察到的个体总数。

3）Simpson优势度指数（Simpson diversity index），公式 $D=1-\Sigma P_i^2$。式中，P_i 种的个体数占群落中总个体数的比例。

4）种间相遇概率指数（PIE），$D=N(N-1)/\Sigma N_i(N_i-1)$。式中，$N_i$ 为种 i 的个体数，N 为所在群落的所有物种的个体数之和。

5）香农-威纳指数（Shannon-wiener index），$H'=-\Sigma P_i\ln P_i$。式中，$P_i=N_i/N$。Pielou均匀度指数，$H_{max}=\ln S$。式中，H 为实际观察的物种多样性指数；H_{max} 为最大的物种多样性指数，$H_{max}=\mathrm{Ln}S$（S 为群落中的总物种数）。

6）Pielou均匀度指数，公式 $E=H/H_{max}$，式中，H 为实际观察的物种多样性指数，H_{max} 为最大的物种多样性指数，$H_{max}=\mathrm{Ln}S$（S 为群落中的总物种数）。

（2）β多样性指数

1）Whittakerz指数（βw），公式 $\beta w=S/m\alpha-1$，式中，S 为所研究系统中记录的物种总数，mα为各样方或样本的平均物种数。

2）Cody指数（βc），公式 $\beta c=[g(H)+l(H)]/2$，式中，$g(H)$ 是沿生境梯度 H 增加的物种数目，$l(H)$ 是沿生境梯度 H 失去的物种数目，即在上一个梯度中存在而在下一个梯度中没有的物种数目。

3）Wilson Shmida指数（βT），公式 $\beta T=[g(H)+l(H)]/2\alpha$，该式是将Cody指数与Whittaker指数结合形成的。式中变量含义与上述两式相同。

（3）γ多样性

香农-威纳指数（Shannon-Wiener Index）。与α多样性指数中的香农-威纳指数计算方法相同，公式同上。费歇尔和普雷斯顿的方法所表示的多样性指数仅包括种的多寡一

方面。香农-威纳指数和辛普森指数则包括了测量群落的异质性。香农-威纳指数借用了信息论方法。信息论的主要测量对象是系统的序（order）或无序(disorder)的含量。在通讯工程中，人们要进行预测，预测信息中下一个是什么字母，其不定性的程度有多大。例如，b b b b b b b 这样的信息流，都属于同一个字母，要预测下一个字母是什么，没有任何不定性，其信息的不定性含量等于零。如果是 a, b, c, d, e, f, g，每个字母都不相同。那么其信息的不定性含量就大。在群落多样性的测度上，就借用了这个信息论中不定性测量方法，就是预测下一个采集的个体属于什么种，如果群落的多样性程度越高，其不定性也就越大。

（4）计算举例

举例 1。设有 *A*、*B*、*C* 三个微生物群落，各由两个物种组成，其中各种个体数组成如表 4-5，请计算它的物种多样性指数。

表 4-5　两个微生物物种组成群落

微生物群落	微生物物种甲	微生物物种乙
群落 A	100（1.00）	0（0.00）
群落 B	50（0.50）	50（0.50）
群落 C	99（0.99）	1（0.01）

Simpson（D）优势度指数：$Dc=1-\Sigma P_i^2=1-\Sigma(N_i/N)^2=1-[(99/100)^2+(1/100)^2]=0.0198$。$DB=1-[(50/100)^2+(50/100)^2]=0.5000$。Shannon-Wiener 指数：$HC=-\Sigma N_i/N \ln N_i/N_i=-(0.99\times\ln0.99+0.01\times\ln0.01)=0.056$。$HB=-(0.50\times\ln0.50+0.50\times\ln0.50)=0.69$。Pielou 均匀度指数：$H_{max}=\ln S=\ln2=0.69$, $EA=H/H_{max}=-[(1.0\times\ln1.0)+0]/0.69=0$, $EB=-(0.50\times\ln0.50+0.50\times\ln0.50)/0.69=0.69/0.69=1$, $EC=0.056/0.69=0.081$。由计算可以看出，群落的物种多样性指数与以下两个因素有关：①种类数目，即丰富度；②种类中个体分配上的均匀性。

举例 2。设有甲群落中 A、B 两个种的个体数分别为 99 和 1，而乙群落中 A、B 两个种的个体数均为 50，按 Simpson 多样性指数计算，甲群落的 Simpson 指数：$D_{甲}=1-(0.9801+0.001)=0.0198$；甲群落的 Simpson 指数：$D_{乙}=1-(0.25+0.25)=0.5$；乙群落的多样性高于甲群落。造成这两个群落多样性差异的主要原因是种的不均匀性，从丰富度来看，两个群落是一样的，但均匀度不同。

9. 微生物群落结构分析实例

（1）概述

以不同海拔茶园土壤微生物群落多样性脂肪酸生物标记分析为例，分析微生物群落结构变化。土壤微生物群落结构影响土壤的理化性质，将土壤的微生物构成特征作为评价土壤质量变化的重要指标，已越来越引起人们的关注（陈宗懋，1992）。茶树是我国亚热带地区的重要经济作物，不同海拔的茶园土壤微生物组成和分布不同，影响茶树的生长，诸多研究（郭琳，2008；薛冬等，2007，2005）表明，不同海拔的土壤能形成特

定的微生物种群。但目前对土壤微生物的研究主要集中在微生物量（彭萍等，2007）、微生物区系（韩文炎，2003）、酶活性（张家华，2007）等指标的变化上，对土壤微生物多样性的研究相对较少，特别是对不同海拔茶园土壤微生物多样性的脂肪酸生物标记还未见报道。目前，测定土壤微生物多样性的方法很多，如平板稀释计数分析、微生物生理生化定量分析、脂肪酸生物标记分析、BIOLOG 微平板分析、分子生物学分析等（文倩等，2008；张海涵等，2007；徐华勤等，2007；Amaan *et al.*，1995; Torsvik and Øvrâs, 2002）。

脂肪酸生物标记分析是一类最常见的微生物生物标记物分析（Steger *et al.*，2003），微生物体的脂肪酸生物标记组成和含量水平具有种属的特异性，其含量和结构与其分类地位密切相关，能够标记特定微生物的存在，是特别有效的生物标记。由于存在于活体微生物细胞膜的脂肪酸生物标记，分布广泛、含量相对恒定，可以对活体个体进行标记，而且对环境因素的变化敏感、分析方法较简单，因此该技术已广泛应用于土壤微生物学研究。

以茶园土壤微生物脂肪酸分析为例，比较不同海拔茶园土壤微生物群落多样性的变化，探讨海拔生态条件对茶园土壤微生物群落的影响，为茶树的种植和生态茶园的建设提供参考。

（2）研究方法

1）样本选择及采集。供试土样来自安溪不同海拔铁观音茶园，具体资料见表 4-6。严格按照标准的 5 点取样，混合均匀放到塑料自封袋中。以茶树主茎为中心半径为 20～30cm 取土，取土深度约为 20cm。实验要求用新鲜土样，所以采集后简单分筛拣出树根等有机杂质即可进行脂肪酸生物标记提取，湿度太高可以稍微晾干，如果不能及时处理土样要进行冻干保存。

表 4-6　不同海拔茶园中采集的土样

土样编号	海拔/m	茶园树龄/年	备注
1	600	3	福建安溪剑斗后山茶场老茶园改造
2	600	3	福建安溪剑斗后山茶场老茶园改造新土
3	500	3	福建安溪剑斗仙荣村
4	700	3	福建安溪感德槐杨茶园
5	700	3	福建安溪感德槐杨茶园新土
6	800	3	福建安溪感德槐东村大岭
7	500	4	福建安溪剑斗仙荣村
8	800	5	福建安溪感德槐东村大岭
9	800	8	福建安溪感德槐东村大岭
10	800	15	福建安溪感德槐东村大岭
11	500	22	福建安溪剑斗仙荣村
12	500	22	福建安溪剑斗仙荣村新土
13	700	22	福建安溪感德槐杨茶园

续表

土样编号	海拔/m	茶园树龄/年	备注
14	700	22	福建安溪感德槐杨茶园新土
15	700	25	福建安溪剑斗黄壤土
16	500	15	福建安溪感德仙荣村新土
17	800	10	福建安溪感德槐东村大岭新土

2）土样脂肪酸生物标记的提取和测定。对土壤微生物群落结构分析，采用脂肪酸生物标记分析法。脂肪酸生物标记分析操作步骤为：将 20ml 0.2mol/L 的 KOH 甲醇溶液和 4g 的新鲜土样加到 50ml 的离心试管中，混合均匀，在 37℃条件下温育 1h（脂肪酸释放，并甲酯化，样品 10min 涡旋一次）。加入 3ml 1.0mol/L 的乙酸溶液中和 pH，充分摇匀。加 10ml 正己烷，使脂肪酸生物标记转到有机相中，600r/min 离心 15min 后，将上层正己烷转到干净试管中，在 N_2 气流下挥发掉溶剂。将脂肪酸生物标记溶解在 1ml 体积比为 1:1 的正己烷:甲基丁基醚溶液中，用作 GC 分析。采用美国 Agilent 6890N 型气相色谱仪，包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器；在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本：二阶程序升高柱温，170℃起始，5℃/min 升至 260℃，而后 40℃/min 升温至 310℃，维持 90s；气化室温度 250℃、检测器温度 300℃；载气为 H_2（2ml/min）、尾吹气为 N_2（30ml/min）；柱前压 10.00psi（1psi=6.895kPa）；进样量 1μl，进样分流比 100:1。脂肪酸生物标记的鉴定采用美国 MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定的 Sherlock MIS 4.5 系统。

3）统计分析方法。①不同海拔茶树根际土壤 PLFA 生物标记聚类分析，将分析结果重复处理计算平均值，构建以脂肪酸生物标记为样本，以不同海拔茶树根际为指标的数据矩阵，分析脂肪酸生物标记在不同海拔茶树根际土的分布。②PLFA 生物标记多样性分析，本研究将脂肪酸生物标记作为数量测度，引入生态学多样性测度 Shannon-Wiener（H_1）多样性指数、丰富度指数（S）、Pielou 均匀度指数（J）、Simpson 优势度指数（D）等方法，分析微生物 PFLAs 生物标记。

A. Shannon-Wiener（H_1）多样性指数。计算公式为：$H_1=-\sum P_i\ln P_i$。式中，$P_i=N_i/N$，N_i 为处理 i 的特征脂肪酸个数，N 为该实验中总特征脂肪酸个数。

B. Pielou（J）均匀度指数。计算公式为：$J=-\sum P_i\ln P_i/\ln S$。式中，S 为微生物群落中脂肪酸（PLFAs）生物标记出现的频次（S），即丰富度。

C. Simpson（D）优势度指数。计算公式为：$D=1-\sum P_i^2$。式中，P_i 为种特征脂肪酸占该试验中总的特征脂肪酸个数比例。

D. Brillouin（H_2）多样性指数计算公式为：$H_2=\frac{1}{N}\lg\left[\frac{N!}{n_1!n_2!\cdots n_i!}\right]$。式中，$n_1$ 为第 1 个脂肪酸生物标记（PLFA）的个体数量，n_2 为第 2 个脂肪酸生物标记的个体数量，n_i 为第 i 个脂肪酸生物标记的个体数量；N 为所有供试处理中脂肪酸生物标记出现的个体总和。

E. Mcintosh（H_3）多样性指数计算公式为：$H_3 = \frac{N-\sqrt{\sum N_i^2}}{N-N\sqrt{S}}$。式中，$N$ 为特征脂肪酸总数。

土壤脂肪酸生物标记聚类分析。以所获得的各脂肪酸生物标记计算出在不同处理样本中的分布频次（S）、PLFAs 值总和、Simpson（D）优势度指数、Pielou（J）均匀度指数、Shannon-Wiener（H_1）多样性指数、Brillouin（H_2）多样性指数、McIntosh（H_3）多样性指数，并以以上参数为指标，以脂肪酸生物标记为样本，构建分析矩阵。以欧氏距离为聚类分析的尺度，用最短距离法对矩阵进行系统聚类，分析利用多样性指标将脂肪酸生物标记归类的结果，阐明其相似程度。

（3）土壤微生物脂肪酸生物标记分析

实验结果见表 4-7。不同海拔茶园土壤脂肪酸生物标记共有 35 个，不同的生物标记代表着不同类型的微生物，在不同海拔茶园土壤中的分布差异显著。有的脂肪酸生物标记在 500m、600m、700m、800m 这 4 个海拔均有分布，称完全分布，如 a15:0，有的生物标记只在特定海拔才有分布 ，称为不完全分布，如 cy17:0 只在海拔 800m 的茶园土壤有分布，其他海拔的茶园土壤中没有分布。

表 4-7　PLFAs 生物标记在不同海拔茶园土壤中的分布

序号	生物标记	微生物类型	海拔/m			
			500	600	700	800
1	20:00	未知	591	0	0	1257
2	20:1ω9c	未知	0	0	0	0
3	a 17:1ω9c	未知	0	0	0	0
4	12:00	未知	424	0	0	0
5	10Me18:0	放线菌	0	0	0	0
6	12:0 3OH	革兰氏阳性菌	0	0	0	0
7	13:0 2OH	未知	0	0	0	0
8	14:00	细菌	588	506	383	1668
9	14:1ω5c	未知	0	0	0	1073
10	15:0 3OH	未知	0	0	0	0
11	15:0	细菌	1602	1590	682	3280
12	i15:0	细菌	1324	1450	428	3105
13	i15:0 3OH	革兰氏阴性菌	0	0	0	937
14	i15:1 F	未知	0	0	0	932
15	i15:1 G	未知	0	0	0	0
16	16:00	假单胞杆菌	7733	7165	4994	16291
17	16:0 10Me	硫酸盐还原细菌	784	1034	583	2404
18	a16:0	革兰氏阳性菌	879	967	0	2955
19	i16:0	革兰氏阳性菌	1196	1524	503	3453

续表

序号	生物标记	微生物类型	海拔/m			
			500	600	700	800
20	16:0 N ALCOHOL	未知	0	0	0	1094
21	16:1 2OH	未知	0	0	0	0
22	16:1ω5c	甲烷氧化菌	914	846	0	2535
23	17:00	节杆菌	0	0	0	0
24	17:0 10 Me	放线菌	0	0	0	0
25	17:0 A	革兰氏阳性菌	1151	1402	586	3699
26	17:0 CYCLO	革兰氏阴性菌	0	0	0	657
27	i17:0	好氧细菌	959	1403	414	3240
28	i17:0 3OH	革兰氏阴性菌	0	0	0	0
29	18:00	嗜热解氢杆菌	1698	1825	1023	5342
30	18:0 2OH	未知	0	0	0	0
31	18:1ω7c	厌氧细菌	1032	925	0	3285
32	18:1ω9c	真菌	3137	2246	1426	10606
33	18:3ω6c (6,9,12)	真菌	1067	1210	0	648
34	19:0 10 Me	未知	0	0	0	0
35	cy19:0ω8c	伯克霍尔德菌	1582	1396	646	3429

注：i、a、cy 和 Me 分别表示异、反异、环丙基和甲基分枝脂肪酸；ω、c 和 t 分别表示脂肪酸端、顺式空间构造和反式空间构造

（4）不同海拔茶树根际土壤微生物 PLFAs 生物标记分析

将各海拔茶树根际土壤的脂肪酸生物标记总量作图，结果见图 4-10。海拔 800m 的茶树根际土壤微生物脂肪酸生物标记种类和数量明显高于海拔 500m、600m 和 700m 的茶树根际土壤微生物脂肪酸生物标记。海拔 800m 茶树根际土壤微生物脂肪酸生物标记

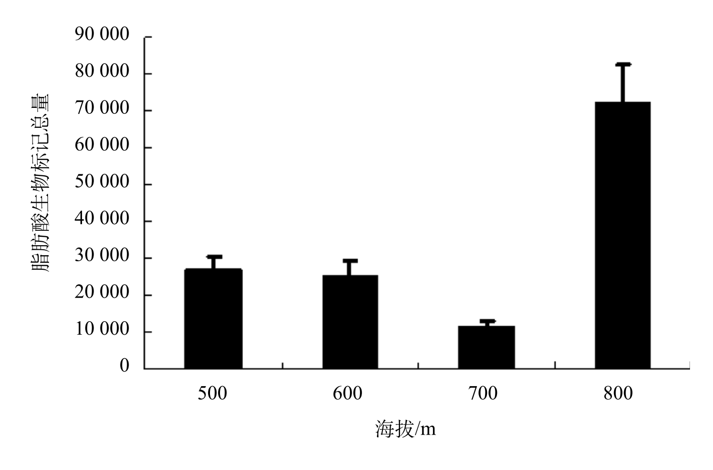


图 4-10　不同海拔茶园土壤脂肪酸生物标记总量比较

有 20 种，数量为 71 890，500m 和 600m 土样的脂肪酸生物标记种类分别是 17 种和 15 种，数量分别是 26 661 和 25 489，而海拔 700m 土壤微生物脂肪酸生物标记种类 11 种，数量是 11 668。因为脂肪酸生物标记总量能够基本上反映出微生物总的含量（齐鸿雁等，2003），这意味着海拔 800m 的茶树根际土壤微生物含量明显比其他几个海拔微生物含量高。

（5）不同海拔茶树根际土壤微生物中真菌、细菌、放线菌特征性 PLFAs 相对生物量

特征峰名为16:0 的是细菌PLFAs的主要生物标记之一，特征峰名为18:3ω6c（6,9,12）的是真菌 PLFAs 主要生物标记之一，特征峰名为 10Me 17:0 的是放线菌 PLFAs 主要的生物标记之一。

从表 4-7、图 4-11 可知，不同海拔茶树根际土壤都没有放线菌存在，代表细菌的 16:0 和代表真菌的 18:3ω6c（6,9,12）相对生物量在不同海拔茶树根际土壤中不同。各海拔茶树根际土壤细菌 16:0 的 PLFAs 相对生物量在海拔 800m 处为最高值，且各海拔茶树根际土壤细菌的 16:0 的 PFLAs 相对生物量大小依次为：海拔 800m 处（16 291）>海拔 500m 处（7733）>海拔 600m 处（7165）>海拔 700m 处（4994）。而各海拔茶树根际土壤真菌 18:3ω6c（6,9,12）的相对生物量大小依次为：海拔 600m 处（1210）>海拔 500m 处（1067）>海拔 800m 处（648）>海拔 700m 处（0）。

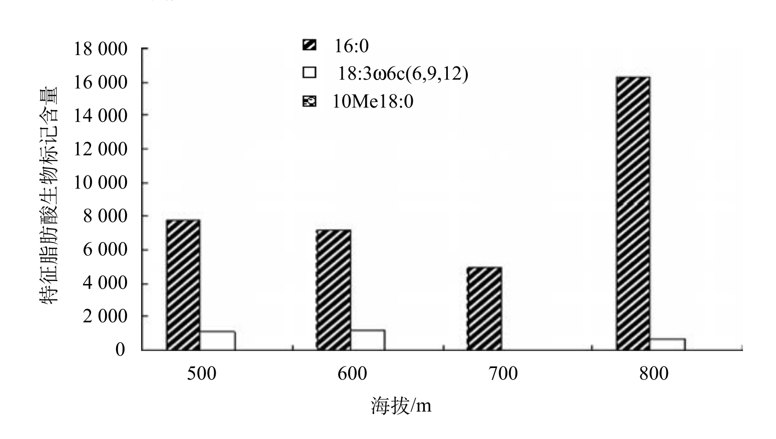


图 4-11　不同海拔茶树根际土壤微生物特征性脂肪酸生物标记含量的变化

（6）微生物群落脂肪酸生物标记的聚类分析

聚类分析结果见图 4-12，当欧氏距离为 42.35 时，可将不同海拔茶园的脂肪酸生物标记分成两个大的类群。类型Ⅰ包括脂肪酸标生物标记 20:00、20:1ω9c、a17:1ω9c、10Me 18:0、12:03OH、13:02OH、14:1ω5c、15:03OH、i15:03OH、i15:1F、i15:1G、16:0N ALCOHOL、16:12OH、17:00、10Me 17:0、i17:03OH、18:02OH、10Me 19:0，其特征为脂肪酸生物标记为不完全分布且分布量低，在各海拔平均分布量见表 4-7；类型Ⅱ包括脂肪酸生物标记 17:0CYCLO、12:00、14:00、18:3ω（6,9,12）、15:0、i16:0、17:0A、18:00、cy19:0ω8c，其特征是脂肪酸生物标记完全分布，在各海拔平均分布量较高。具体数据参照表 4-7。

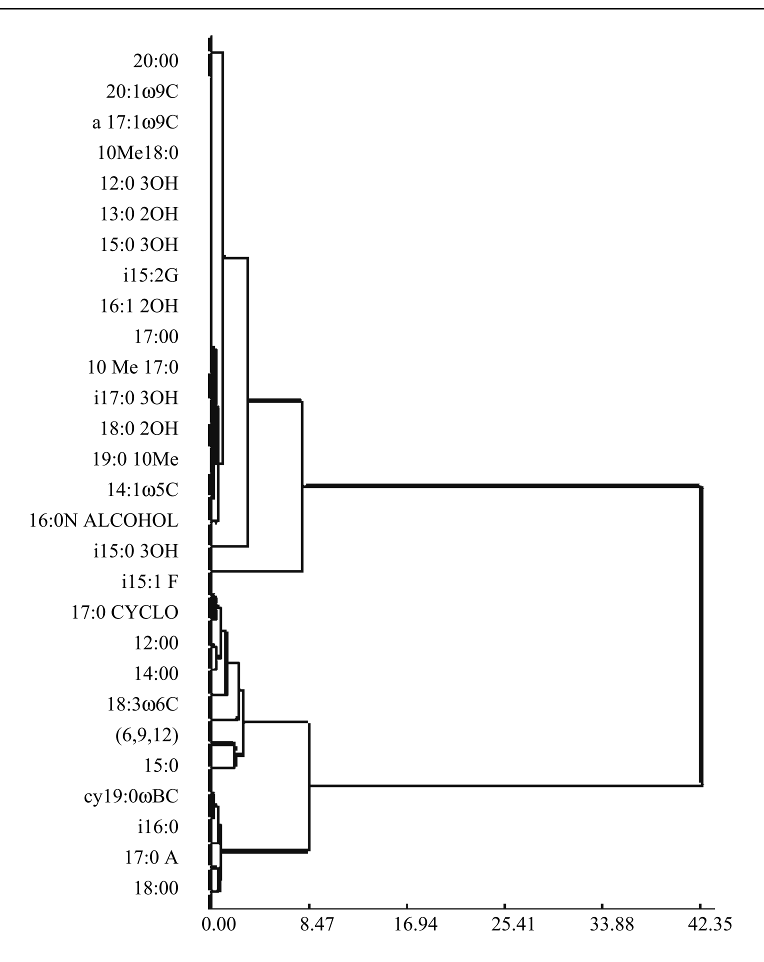


图 4-12　不同海拔茶园土壤微生物脂肪酸生物标记聚类分析

（7）不同海拔茶树根际土壤微生物群落多样性分析

微生物群落多样性指数见表 4-8，经主成分分析，相关系数见表 4-9，特征值见表 4-10，主成分分析因子得分见表 4-11。Simpson（D）优势度指数、Pielou（J）均匀度指数、Shannon-Wiener（H_1）多样性指数、Brillouin（H_2）多样性指数、McIntosh（H_3）多样性指数之间的相关系数大于 0.90，表明这几个指数的互换性较高，选择其中一个就行。特征值分析结果表明，选择第一主成分，含有总体信息量的 93%。从主成分分析因子得分可知，影响第一主成分的主要因素是 Simpson（D）（得分 0.81）和 Pielou（J）均匀度（得分 0.10）。因而，微生物群落多样性指数的分析可以使用 Simpson（D）和均匀度。

表 4-8　不同海拔茶树根际土壤微生物群落多样性指数

序号	海拔/m	D	H_1	J	H_2	H_3
1	500	0.88	3.59	0.88	3.58	0.65
2	600	0.88	3.54	0.91	3.53	0.66
3	700	0.78	2.81	0.81	2.80	0.53

续表

序号	海拔/m	D	H_1	J	H_2	H_3
4	800	0.90	3.84	0.87	3.83	0.69

注：Simpson（D）优势度指数、Pielou（J）均匀度指数、Shannon-Wiener（H_1）多样性指数、Brillouin（H_2）多样性指数、McIntosh（H_3）多样性指数

表 4-9　微生物群落多样性指数相关系数

相关系数	D	H_1	J	H_2	H_3
X（1）	1.0000	0.9915	0.8513	0.9915	0.9964
X（2）	0.9915	1.0000	0.7775	1.0000	0.9928
X（3）	0.8513	0.7775	1.0000	0.7775	0.8382
X（4）	0.9915	1.0000	0.7775	1.0000	0.9928
X（5）	0.9964	0.9928	0.8382	0.9928	1.0000

注：Simpson（D）优势度指数、Pielou（J）均匀度指数、Shannon-Wiener（H_1）多样性指数、Brillouin（H_2）多样性指数、McIntosh（H_3）多样性指数

表 4-10　微生物群落多样性指数特征值

序号	特征值	百分率	累计百分率
1	4.69	93.90	93.90
2	0.30	6.03	99.93
3	0.00	0.07	100.00
4	0.00	0.00	100.00
5	0.00	0.00	100.00

表 4-11　微生物群落多样性指数主成分分析因子得分

序号	Y（i,1）	Y（i,2）	Y（i,3）	Y（i,4）	Y（i,5）
N（1）	0.81	0.02	0.10	0.00	0.00
N（2）	1.10	0.82	−0.04	0.00	0.00
N（3）	−3.70	−0.11	−0.01	0.00	0.00
N（4）	1.79	−0.73	−0.05	0.00	0.00

Shannon-Wiener（H_1）多样性指数受群落物种丰富度影响较大，Simpson（D）优势度指数则较多反映群落中常见的物种，从表 4-8 可见，海拔 800m 处的茶树根际土壤的 Shannon-Wiener（H_1）多样性指数 3.84 明显高于海拔 500m 的 3.59、600m 的 3.54 和 700m 的 2.81，说明海拔 800m 处茶树根际土壤中的微生物丰富度高于其他 3 个海拔处茶树根际土壤的微生物群落，而海拔 500m 和 600m 的茶树根际土壤微生物丰富度相当，海拔 700m 的茶树根际土壤微生物群落丰富度较低。

不同海拔茶树根际土壤的 Simpson（D）优势度指数变化与 Shannon-Wiener（H_1）多

样性指数变化相同，海拔 800m 处茶树根际土壤微生物群落的 Simpson（*D*）优势度指数最高为 0.90，其次是海拔 500m 和 600m 的茶树根际土壤微生物群落，它们的 Simpson（*D*）优势度指数是 0.88，海拔 700m 的茶树根际土壤微生物群落 Simpson（*D*）优势度指数最低为 0.78，说明海拔 800m 茶树根际土壤微生物种类最多，海拔 700m 的茶树根际土壤微生物种类最低（图 4-13）。

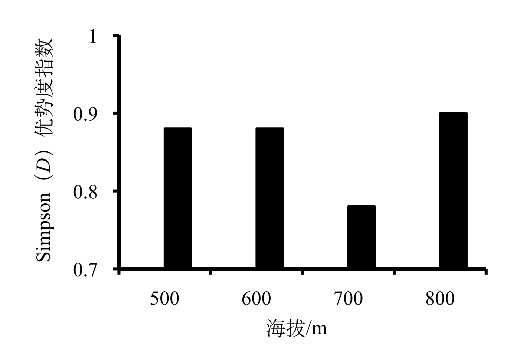


图 4-13　不同海拔茶树根际土壤微生物群落 Simpson（*D*）优势度指数

从均匀度指数看，海拔 600m 茶树根际土壤微生物群落 Pielou（*J*）均匀度指数最高，其次是海拔 800m 的茶树根际土壤微生物群落，接下来是海拔 500m 的茶树根际土壤微生物群落，而海拔 700m 的茶树根际土壤微生物群落 Pielou（*J*）均匀度指数最低。Pielou（*J*）均匀度是微生物组成和分布量的综合体现，不同海拔茶树根际土壤 Pielou（*J*）均匀度的明显差异，说明各海拔茶树根际土壤的微生物存在丰富的多样性（图 4-14）。

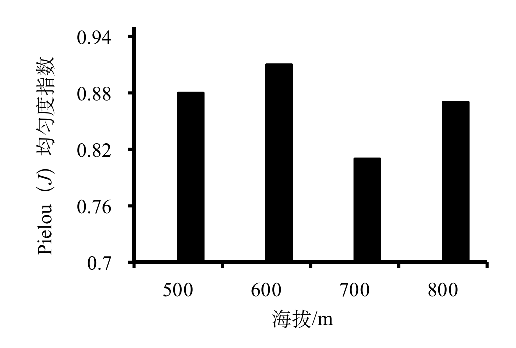


图 4-14　不同海拔茶树根际土壤微生物群落 Pielou（*J*）均匀度指数

（8）讨论

土壤是生态系统中进行物质循环和能量转化的重要场所，土壤微生物则是这两个功能的主要完成者。由于土壤微生物中仅 0.2%左右的种类能够培养（Vigdis and Lisc, 2002），若以培养技术为基础来研究土壤微生物生态就会丧失较多信息。脂肪酸生物标记（PLFA）的引入为土壤微生物的研究开创新局面。脂肪酸生物标记是微生物细胞膜的主要成分，微生物死亡后，PLFA 将迅速分解（Bossio *et al.*, 2005），因此，所测定的土壤 PLFA 可以指示土壤微生物量。不同土壤微生物其 PLFA 的组成和结构存在差异，Graham 等（2001）

比较了 8 个耕地土壤的 PLFA，发现每个土壤都有特异的 PLFA 图谱，称为土壤指纹。本研究对不同海拔茶树根际土壤进行 PLFA 生物标记测定，发现不同海拔茶树根际土壤所含 PLFA 的种类和数量都不同，高海拔 800m 处，PLFA 种类最多为 20 种、含量最大 71 890，这是由于高海拔低温、潮湿的环境导致土壤积累较多的土壤有机质（陈灏等，2002），而有机质含量越大，土壤微生物量也就越大，这与徐秋芳等（2005）对灌木林和阔叶林土壤微生物群落研究得出的结论一致。Díax-Raviña 等（1995）也认为土壤微生物数量分布受当地气候条件、水热状况、土壤营养状况、土壤质地、植被组成等的综合影响。海拔的变化将改变植被组成、结构、土壤温度、水分、养分、有机质分解、微生物活性等一系列因子（Rodeghiero and Cesaltu, 2005），这些因子均可以显著影响土壤微生物群落结构。另一个值得注意的是茶园根际土壤脂肪酸图谱中指示革兰氏阴性菌的脂肪酸生物标记 17:0 CYCLO、i15:0 3OH 只有在海拔 800m 的土样中出现。至于具体原因还难以弄清楚，值得进一步探讨。土壤 pH 会影响土壤微生物的群落结构。Frostegård 等（1993）报道施用石灰等碱性物质后，森林土壤 PLFA 有明显的变化。本研究对不同海拔茶树根际土壤的 PLFA 检测都没有放线菌存在，这可能与茶树喜酸的特性有密切关系，茶树根际土壤酸性为 3.8～4.5，而放线菌适于在碱性环境中生活（陈敏和赵立平，2003）。PLFA 测试系统是快速测定土壤微生物群落结构多样性的一种有效手段，但由于土壤是一个复杂的且易变的生态系统，对土壤微生物群落结构多样性的研究仅靠土壤脂肪酸分析是不够的，还需要与其他分析技术如 BIOLOG、基因图谱等相结合，才能逐渐揭开土壤微生物群落结构这个“黑箱”。

六、微生物生物圈

生物圈的概念是由奥地利地质学家休斯 Suess（1875）首次提出的，是指地球上有生命活动的领域及其居住环境的整体。生物圈是自然灾害主要发生地，它衍生出环境生态灾害。生物圈是地球上凡是出现并感受到生命活动影响的地区，是地表有机体包括微生物及其自下而上环境的总称，是行星地球特有的圈层，它也是人类诞生和生存的空间。生物圈的范围是包括海平面以上约 10 000m 和海平面以下 11 000m 处，是指地球上有生命活动的领域及其居住环境的整体，但绝大多数生物通常生存于地球陆地之上和海洋表面之下各约 100m 厚的区域内，如果把地球看作一个足球大小，那么生物圈就比一张纸还要薄。

生物圈主要由生命物质、生物生成性物质和生物惰性物质 3 部分组成。生命物质又称为活质，是生物有机体的总和；生物生成性物质是由生命物质所组成的有机矿物质相互作用的生成物，如煤、石油、泥炭和土壤腐殖质等；生物惰性物质是指大气低层的气体、沉积岩、黏土矿物和水。由此可见，生物圈是一个复杂的、全球性的开放系统，是一个生命物质与非生命物质的自我调节系统。它的形成是生物界与水圈、大气圈及岩石圈（土圈）长期相互作用的结果，生物圈存在的基本条件是：第一，必须获得来自太阳的充足光能。因一切生命活动都需要能量，而其基本来源是太阳能，绿色植物吸收太阳能合成有机物而进入生物循环。第二，要存在可被生物利用的大量液态水。几乎所有的生物都含有大量水分，没有水就没有生命。第三，生物圈内要有适宜生命活动的温度条

件，在此温度变化范围内的物质存在气态、液态和固态三种变化。第四，提供生命物质所需的各种营养元素，包括 O_2、CO_2、N、C、K、Ca、Fe、S 等，它们是生命物质的组成或中介。总之，地球上有生命存在的地方均属生物圈。

生物圈里繁衍着各种各样的生命，为了获得足够的能量和营养物质以支持生命活动，在这些生物之间，存在着吃与被吃的关系。“大鱼吃小鱼，小鱼吃虾米”，这句俗语就体现了这样一种简单的关系。但是，要维持整个庞大的生物圈的生命活动，这么简单的关系显然是不行的。

生物圈中的各种生物，按其在物质和能量流动中的作用，可分为 3 类：生产者，主要是绿色植物，它能通过光合作用将无机物合成为有机物。消费者，主要指动物（人当然也包括在内）。有的动物直接以植物为生，称为一级消费者，如羚羊；有的动物则以植食动物为生，称为二级消费者；还有的捕食小型肉食动物，称为三级消费者。至于人，则是杂食动物。分解者，主要指微生物，可将有机物分解为无机物。这 3 类生物与其所生活的无机环境一起，构成了一个生态系统：生产者从无机环境中摄取能量，合成有机物；生产者被一级消费者吞食以后，将自身的能量传递给一级消费者；一级消费者被捕食后，再将能量传递给二级、三级……最后，当有机生命死亡以后，分解者将它们再分解为无机物，把来源于环境的，再复归于环境。这就是一个生态系统完整的物质和能量流动。只有在生态系统内生物与环境、各种生物之间长期的相互作用下，生物的种类、数量及其生产能力都达相对稳定的状态时，系统的能量输入与输出才能达平衡；反过来，只有能量达平衡，生物的生命活动也才能相对稳定。因此，生态系统中的任何一部分都不能被破坏，否则，就会打乱整个生态系统的秩序。地球表层由大气圈、水圈和岩石圈构成，三圈中适于生物生存的范围就是生物圈。水圈中几乎到处都有生物，但主要集中于表层和浅水的底层。世界大洋最深处超过 11 000m 处，还能发现深海生物。限制生物在深海分布的主要因素有缺光、缺氧和随深度而增加的压力。大气圈中生物主要集中于下层，即与岩石圈的交界处。鸟类能高飞数千米，花粉、昆虫及一些小动物可被气流带至高空，甚至在 22 000m 的平流层中还发现有细菌和真菌。限制生物向高空分布的主要因素有缺氧、缺水、低温和低气压。在岩石圈中，生物分布的最深记录是生存在地下 2500～3000m 处石油中的石油细菌，但大多数生物生存于土壤上层几十厘米之内。限制生物向土壤深处分布的主要因素有缺氧和缺光。由此可知，虽然生物可见于由赤道至两极之间的广大地区，但就厚度来讲，生物圈在地球上只占据薄薄的一层。

七、微生物生态系统

微生物生态系统的类型：微生物生态系统、森林生态系统、草原生态系统、湿地生态系统、淡水生态系统、农田生态系统、海洋生态系统、城市生态系统等。生态系统是一个统一的整体，是地球上最大的生态系统，是所有生物共同的家园。人们必须明白，人也是生态系统中扮演消费者的一员，人的生存和发展离不开整个生态系统的发展。因此，保护生态系统就是保护我们自己。

地球是生物起源和进化的理想环境。已知的生命现象都离不开液态水。地球与太阳的距离及地球的自转使地表温度足以维持液态水的存在；地球的引力保证了大部分气态

分子不至于逃逸到太空去。地球的磁场屏蔽了一部分高能射线，使地表生物免遭伤害。然而这一切只是为生命提供了存在的可能性。现今地球上生存的各种生物都是几十亿年生物进化的结果，是生物与环境长期交互作用的产物。当地球上刚出现生命时，原始大气还富含甲烷、氨、硫化氢和水汽等含氢化合物，属还原性。现今的大部分生物都不能在其中生存。后来出现了蓝藻，它可以通过光合作用放出游离氧，使大气含氧量逐渐增多，变为氧化性，为需氧生物的出现开辟了道路。随着氧气的增多，在高空出现了臭氧层，阻止紫外线对生命的辐射伤害，于是过去只能躲在海水深处才能存活的生物便有可能发展到陆地上。但生物初到陆地上时，遇到的只是岩石和风化的岩石碎屑，大部分高等植物不能赖以生存，只是在低等植物和微生物的长期作用下，才形成了肥沃的土壤。经过长期的生物进化，最后出现了广布世界的各种植物和栖息其间的各种动物，逐步形成了目前的生态系统。

地球与太空几乎没有物质交换，却接受大量太阳辐射能，太阳能是维持一切生命活动的原动力，能量在生态系统中逐级传送，最后以热能形式散发到太空。太阳辐射在地球上的不均匀分布，造成了不同的气候类型，从而影响了地球上的生物分布；它也是地面气流（风）、水流和水汽循环的主要动因。生态系统中的能流与物流是相伴随的，因为太阳辐射能先通过光合作用被植物体固定下来，然后以化学能的形式沿食物链逐级传递。动物和微生物的取食活动就是传递能量的方式。一般来说，化学元素进入生物体内是靠生物的主动摄取，而化学元素在自然界中的循环运动则是由气流和水流来完成的。陆地生物生存于大气之中，气态营养物和废物很容易在生物与环境间循环运动。一般可溶性物质是随水进出生物体的。就全球来讲，江河中所携带的可溶性物质，只能随水流由高向低移动，最后归入湖泊和海洋。当湖水和海水蒸发时，这些物质被留下，有的还形成沉积物，能以气溶胶等形式回到陆地的极少。因此液态的物质循环常常是不完全的。

微生物繁殖能力和适应环境的能力很好，正所谓“物竞天择，适者生存”。作为食物链的最底层，要求其数量多且分布广。微生物的生命力十分惊人，对自然环境要求低，所以在生物圈中，微生物数量极多，分布极广。微生物的个体很小，所以它生活的环境也就十分微小，甚至肉眼看不见。因此，微生物生态学家称为微环境（micro-environment）。例如，在一颗 3mm 大小的土粒中，由于化学和物理等因素的不同，可以存在几种不同的生境，这一点可通过微电极测量土粒中氧的浓度分布情况来证实。从测定结果可明显地看到土壤颗粒中氧的分布是不均匀的。在等高线图上，每条带可以认为是一个不同的微环境，支持不同特性的微生物共同生活在同一小土粒中，即厌氧微生物生活在土粒中心，稍外部分需氧微生物生长活跃，专性好氧微生物可以生活在土壤外层；而兼性需氧菌可以分布在土壤颗粒的各个部位。由于时间和空间的不同，微环境的物理化学条件也会发生很快的改变。因此，微环境本身也是非均质的，而且在一个给定的微环境中，其条件变化很快。地球上存在无数的微生物微环境。正是因为如此，人们今天才看得到微生物种的多样性。

微生物是地球上生物多样性最为丰富的资源。微生物的种类仅次于昆虫，是生命世界里的第二大类群。然而由于微生物的微观性，以及研究手段的限制，许多微生物的种群还不能分离培养，其已知种占估计种的比例仍很小。从下面的两张统计表中可以看出

（表 4-12，表 4-13），微生物是生物中一群重要的分解代谢类群，没有微生物的活动地球上的生命是不可能存在的。它们是地球上最早出现的生命形式，其生物多样性在维持生物圈和为人类提供广泛而大量的未开发资源方面起着主要作用。微生物的多样性包括所有微生物的生命形式、生态系统和生态过程，以及有关微生物在遗传、分类和生态系统水平上的知识概念。物种是生物多样性的表现形式，与其他生物类群相比，人类对微生物物种多样性的了解最为贫乏。以原核生物界为例，除少数可以引起人类、家畜和农作物疾病的物种外，对其他物种知之甚少。人们甚至不能对世界上究竟存在多少种原核生物做出大概的估计。

表 4-12　中国微生物已知物种数与世界已知物种数的比较

类群	中国的物种数	世界的物种数	中国占世界物种数的比例/%
病毒	400	5 000	8.0
细菌	500	4 760	10.5
真菌	8 000	72 000	11.6

表 4-13　微生物的已知种数和估计总种数

类群	已知种数	估计总种数	已知种占总种数比例/%
病毒	5 000	130 000	4
细菌	4 760	40 000	12
真菌	72 000	1 500 000	5

真菌是与人类关系比较密切的生物类群，目前已定名的真菌约有 8 万种，但据估计地球上真菌的数量约为 150 万种，也就是说人们已经知道的真菌仅为估计数的 5%。微生物的多样性除物种多样性外，还包括生理类群多样性、生态类型多样性和遗传多样性。微生物的生理代谢类型之多，是动植物所不及的。微生物有着许多独特的代谢方式，如自养细菌的化能合成作用，厌氧生活，不释放氧的光合作用，生物固氮作用，对复杂有机物的生物转化能力，分解氰、酚、多氯联苯等有毒物质的能力，抵抗热、冷、酸、碱、高渗、高压、高辐射剂量等极端环境的能力，以及病毒以非细胞形态生存的能力等。微生物产生的代谢产物种类多，仅大肠杆菌一种细菌就能产生 2000～3000 种不同的蛋白质。天然抗生素中，2/3 的比例（超过 4000 种）是由放线菌产生的。微生物所产酶的种类也是极其丰富的，从各种微生物中发现，仅 II 型限制性内切酶就有 1443 种。

微生物与生物环境间的相互关系也表现出多样性，主要有互生（和平共处，平等互利或一方受益，如自生固氮菌与纤维分解细菌）、共生（相依为命，结成整体，如真菌与蓝细菌共生形成地衣）、寄生（敌对，如各种植物病原菌与宿主植物）、拮抗（相克、敌对，如抗生素产生菌与敏感微生物）和捕食（如原生动物吞食细菌和藻类）等关系。与高等生物相比，微生物的遗传多样性表现更为突出，不同种群间的遗传物质和基因表达具有很大的差异。全球性的微生物基因组计划已经展开，截至 2000 年 4 月的统计，已有 27 个原核生物的全基因组序列全部完成发表，另有 95 个正在进行中；4 个真核生物

的全基因组序列已完成发表，21 个正在进行中。基因组时代的到来，必然将一个崭新的、全面的和内在的微生物世界展现在人们面前。微生物资源的开发，是 21 世纪生命科学生命力之所在。由于动植物物种消失是可以估计的，这就意味着微生物多样性的消失现象也在发生，如何利用和保护微生物多样性已成为亟待解决的问题。近年来，世界各国和国际组织已对此做了许多努力，并提出了一项微生物多样性行动计划，随着这项计划的逐步实施，人类将从微生物生物多样性的利用和保护中受益。这项计划包括：建立推动微生物多样性研究的国际组织；召开关于微生物“种”的概念和分类指征研讨会；提出已知种的目录；发展微生物分离、培养和保藏的技术；发展微生物群落取样的标准；提出选择自然保护区和其他需要长期保护的生态系等。

第二节　芽胞杆菌种群生长曲线

一、概述

细菌群体生长规律。细菌接种到均匀的液体培养基后，当细菌以二分裂法繁殖时，分裂后的子细胞都具有生活力。在不补充营养物质或移去培养物，保持整个培养液体积不变的条件下，以时间为横坐标，以菌数为纵坐标，根据不同培养时间细菌数量的变化，可以做出一条反映细菌在整个培养期间菌数变化规律的曲线，这种曲线称为生长曲线（growth curve）。一条典型的生长曲线至少可以分为迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期等 4 个生长时期。

1）迟缓期（lag phase），又称为延滞期、适应期。细菌接种到新鲜培养基而处于一个新的生长环境，因此在一段时间里并不马上分裂，细菌的数量维持恒定，或增加很少。此时胞内的 RNA、蛋白质等物质含量有所增加，细胞体最大，说明细菌并不是处于完全静止的状态。产生迟缓期的原因，认为是微生物接种到一个新的环境，暂时缺乏足够的能量和必需的生长因子，“种子”老化（即处于非对数生长期）或未充分活化，接种时造成损伤等。在工业发酵和科研中迟缓期会增加生产周期而产生不利的影响，但是迟缓期无疑也是必需的，因为细胞分裂之前，细胞各成分的复制与装配等也需要时间，因此应该采取一定的措施：①通过遗传学方法改变种的遗传特性使迟缓期缩短；②利用对数生长期的细胞作为“种子”；③尽量使接种前后所使用的培养基组成不要相差太大；④适当扩大接种量等方式缩短迟缓期，克服不良的影响。

2）对数生长期（logarithmic phase）。又称为指数生长期（exponential phase）。细菌经过迟缓期进入对数生长期，并以最大的速率生长和分裂，导致细菌数量呈对数增加，而且细菌内各成分按比例有规律地增加，此时期的细菌生长是平衡生长。对数生长期细菌的代谢活性、酶活性高而稳定，大小比较一致，生活力强，因而它广泛地在生产上被用作“种子”和在科研上作为理想的实验材料。

3）稳定生长期（stationary phase）。由于营养物质消耗，代谢产物积累和 pH 等环境变化，逐步不适宜于细菌生长，导致细菌生长速率降低直至零（即细菌分裂增加的数量等于细菌死亡数量），结束对数生长期，进入稳定生长期。稳定生长期的细菌数最高

并维持稳定。如果及时采取措施，补充营养物质或取走代谢产物或改善培养条件，如对好氧菌进行通气、搅拌或振荡等可以延长稳定生长期，获得更多的菌体物质或代谢产物。

4）衰亡期（decline 或 death phase）。营养物质耗尽和有毒代谢产物的大量积累，细菌死亡速率逐步增加和活细菌逐步减少，标志其进入衰亡期。该时期细菌代谢活性降低，细菌衰老并出现自溶。该时期死亡的细菌以对数方式增加，但在衰亡期的后期，由于部分细菌产生抗性也会使细菌死亡的速率降低。

此外，不同的微生物，甚至同一种微生物对不同物质的利用能力是不同的。有的物质可直接被利用（如葡萄糖或 NH_4^+等）；有的需要经过一定的适应期后才能获得利用能力（如乳糖或 NO_3^-等）。前者通常称为速效碳源（或氮源），后者称为迟效碳源（或氮源）。当培养基中同时含有这两类碳源（或氮源）时，微生物在生长过程中会产生二次生长现象。

由于芽胞杆菌菌种培养方式、培养条件等不同，生长也有不同的特征，因而，不完全符合指数生长特征，需要对指数模型进行修正，以便更好地反映细菌的生长特征，对指数模型进行修正，修正后的模型对于实验中的“S”型生长曲线很适宜。

二、芽胞杆菌生长曲线

1. 短短芽胞杆菌生长曲线

短短芽胞杆菌 JK-2 菌体生长曲线测定见表 4-14。短短芽胞杆菌 JK-2 的延迟期在 1～6h、指数期在 6～16h、稳定期 16～26h 和衰亡期 26h 以后。这说明接种到发酵液的最好时间应在其生长的指数期即在 24h 左右，发酵的时间在 26h 左右为最佳，因为到衰亡期时，细菌死亡，菌体破裂，给胞外物质分析带来困难。取 2～20h 菌株生长数据，进行生长曲线拟合，结果表明幂指数方程拟合最佳（图 4-15），拟合过程如下：

对数方程拟合：　$y = 0.048e^{0.2433x}$　　$R^2 = 0.8636$

幂指数方程拟合：　$y = 0.0071x^{2.0826}$　　$R^2 = 0.9276$

抛物线方程拟合：　$y = -0.0021x^2 + 0.2297x - 0.7752$　　$R^2 = 0.9282$

对数方程拟合：　$y = 1.4174\ln(x) - 1.7024$　　$R^2 = 0.8180$

线性方程拟合：　$y = 0.1825x - 0.586$　　$R^2 = 0.9249$

表 4-14　短短芽胞杆菌 JK-2 菌体生长曲线测定

时间/h	OD 值 Ⅰ	OD 值 Ⅱ	OD 值 Ⅲ	平均值
2	0.06	0.05	0.04	0.05
4	0.11	0.06	0.08	0.08
6	0.14	0.13	0.15	0.14
8	0.48	0.42	0.45	0.45
10	1.30	1.27	1.31	1.29
12	1.81	1.88	1.99	1.90
14	2.28	2.39	2.54	2.41

续表

时间/h	OD 值Ⅰ	OD 值Ⅱ	OD 值Ⅲ	平均值
16	2.50	2.58	2.64	2.57
18	2.58	2.67	2.71	2.65
20	2.63	2.69	2.70	2.67
22	2.71	2.80	2.78	2.76
24	2.70	2.83	2.80	2.77
26	2.43	2.70	2.68	2.60
28	2.49	2.66	2.57	2.57
30	2.40	2.62	2.52	2.52
32	2.50	2.67	2.56	2.57
34	2.43	2.66	2.55	2.55
36	2.56	2.66	2.61	2.61

2. 枯草芽胞杆菌生长曲线

枯草芽胞杆菌 B-6-6 生长曲线的测定结果见图 4-16，0～2h 为菌株的生长迟缓期，菌株刚刚开始生长；2～6h 为对数生长期，菌株生长迅速；6～18h 为平稳生长期，最高生长点出现在 14h，此时 OD_{600} 值为 2.572，18～20h OD_{600} 值突然下降，20～22h OD_{600} 值又有所回升，之后进入平稳生长期，对于 20～22h OD_{600} 值又开始增大的原因可能是菌的细胞破裂，分泌物外流所致。生长曲线模型为：y=0.9431ln（x）+0.4129，R^2=0.7295。

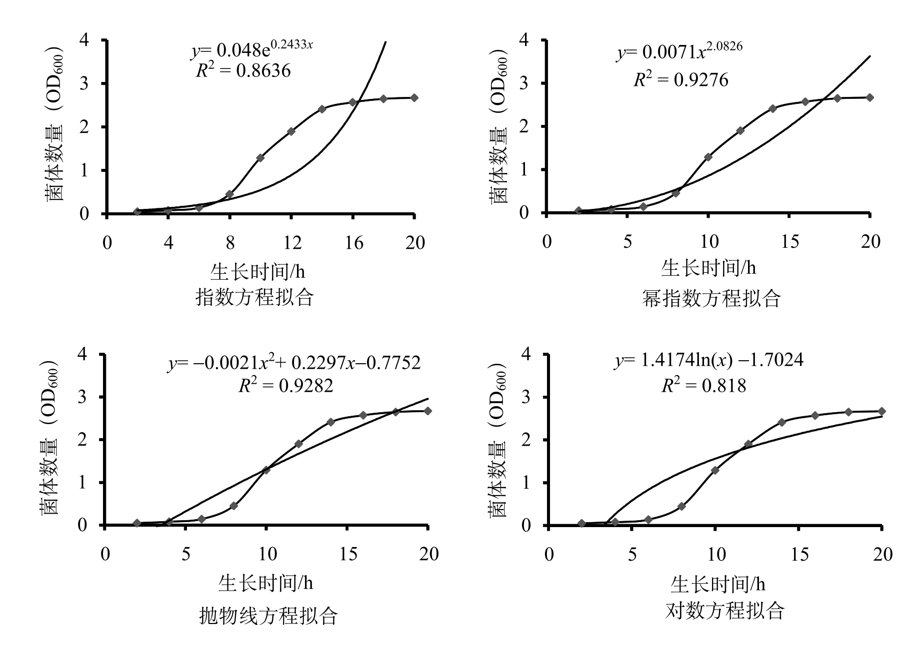


图 4-15　短短芽胞杆菌 JK-2 菌体生长曲线拟合

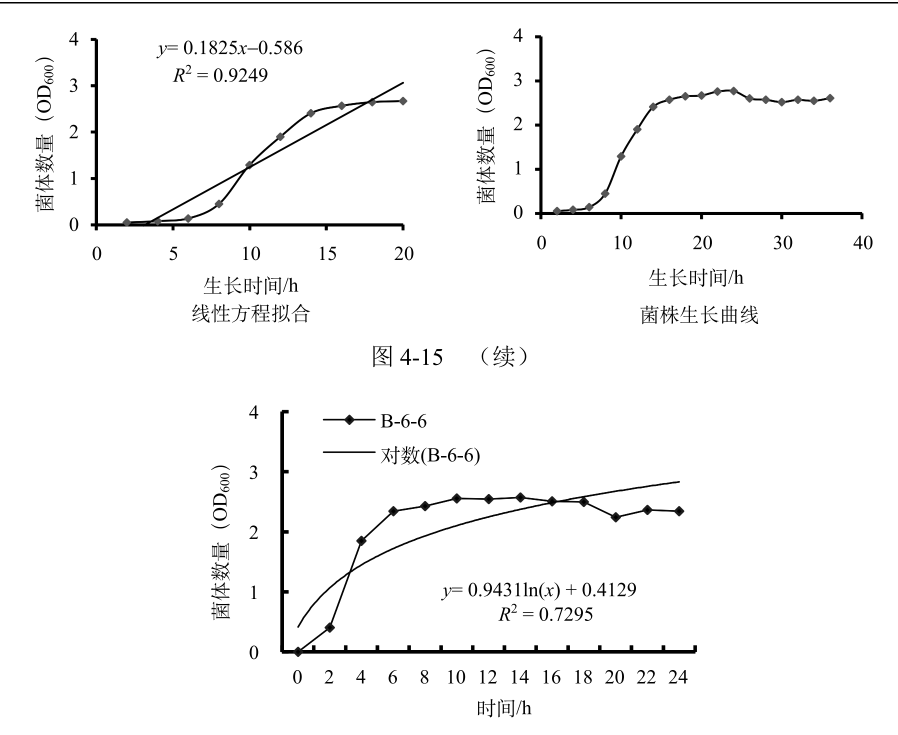


图 4-15　（续）

图 4-16　枯草芽胞杆菌菌株 B-6-6 的生长曲线

3. 凝结芽胞杆菌生长曲线

凝结芽胞杆菌 Lp-6 生长曲线的测定结果见图 4-17，0～2h 为菌株的生长迟缓期，菌株刚刚开始生长；2～10h 为对数生长期，菌株生长迅速；10～20h 为平稳生长期，最高生长点出现在 10h，此时 OD_{600} 值为 2.457。因此，菌株 Lp-6 的种子液制备时间最好是在其生长最高点 10h 左右，然后开始发酵。生长曲线模型为：y=1.1344ln（x）+0.0211，R^2=0.8813。

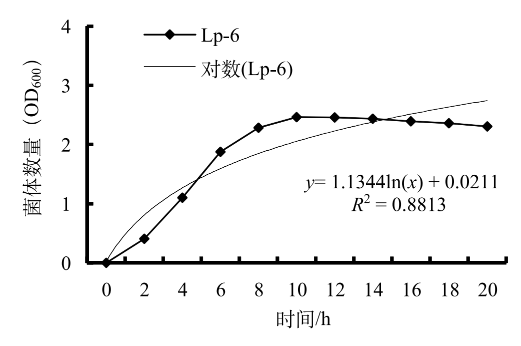


图 4-17　凝结芽胞杆菌菌株 Lp-6 的生长曲线

4. 左旋乳酸芽胞杆菌生长曲线

左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 生长曲线的测定结果见图 4-18，0～2h 为菌株的生长迟缓

期，菌株刚刚开始生长；2～6h 为对数生长期，菌株生长迅速；6～18h 为平稳生长期，最高生长点出现在 12h，此时 OD_{600} 值为 2.513。生长曲线模型为：y=1.2179ln（x）–0.0065，R^2=0.848。

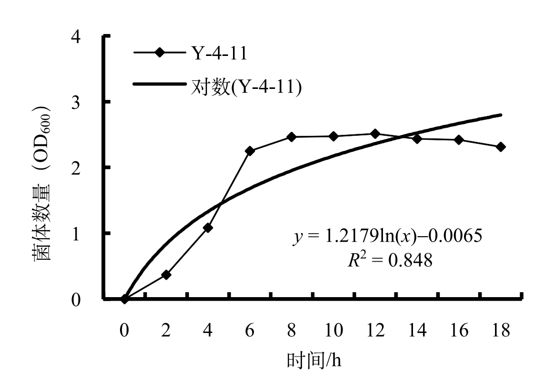


图 4-18　左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 的生长曲线

5. 类芽胞杆菌生长曲线

浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12 生长曲线的测定结果见图 4-19，0～2h 为菌株的生长迟缓期，菌株刚刚开始生长；2～6h 为对数生长期，菌株生长迅速；6～10h 为平稳生长期，最高生长点出现在 10h，此时 OD_{600} 值为 2.549。随后菌株生长的 OD_{600} 值开始缓慢下降，至 20h 时，菌株开始进入平稳生长期。生长曲线模型为：y=0.9692ln（x）+0.2389，R^2=0.7332。

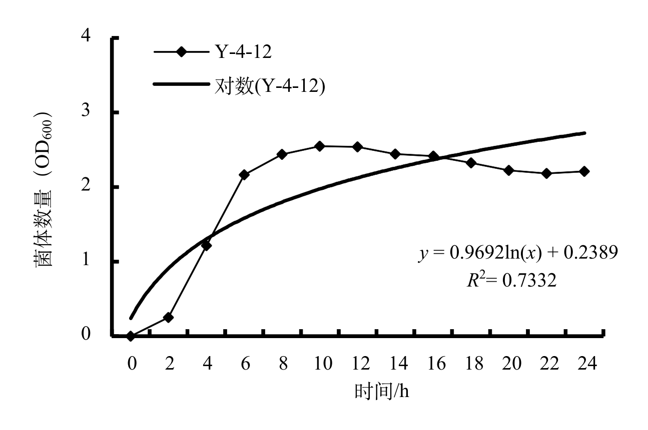
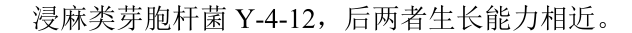


图 4-19　类芽胞杆菌 Y-4-12 的生长曲线

三、芽胞杆菌生长动力学

1. 芽胞杆菌生长能力比较

在 30℃培养下的各菌株间的生长关系见图 4-20 和表 4-15。枯草芽胞杆菌 B-6-6 和凝结芽胞杆菌 Lp-6 在 30℃温度下的生长能力相近，显著高于左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 和


浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12，后两者生长能力相近。

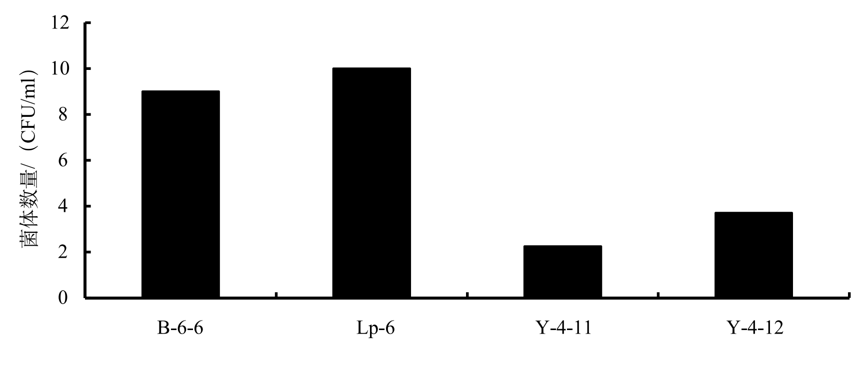


图 4-20　各菌株在 30℃温度下的生长能力

表 4-15　各菌株单独培养在 30℃温度下的生长能力

项目	菌株生长量			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
细菌生长量/（CFU/ml）	9×10^6	10×10^6	2.25×10^6	3.7×10^6

2. 芽胞杆菌温度动力学模型

枯草芽胞杆菌 B-6-6、凝结芽胞杆菌 Lp-6、左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 和浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12 在相同培养基条件下，对温度的适应性差异显著（表 4-16，图 4-21）；枯草芽胞杆菌 B-6-6 生长的最佳温度为 55℃，属高温型菌株；凝结芽胞杆菌 Lp-6 生长的最佳温度为 50℃，左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 生长的最佳温度为 45℃，浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12 生长的最佳温度为 35℃。

表 4-16　各菌株单独培养的生长能力

培养温度/℃	菌株生长量/（$\times10^6$CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
30	9	10	2.25	3.7
35	12	9.0	3.1	6
40	14	10	4	3
45	15.2	12	5.75	2
50	20	27	4.3	1.45
55	47.6	5	3.7	0

枯草芽胞杆菌 B-6-6 温度动力学模型：　$y = 6.1877e^{0.2841x}$　（$R^2 = 0.8503$）

凝结芽胞杆菌 Lp-6 温度动力学模型：　$y = 6.2612e^{0.2274x}$　（$R^2 = 0.6450$）

左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 温度动力学模型：$y = -0.2973x^2 + 2.4412x - 0.185$（$R^2 = 0.7977$）
浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12 温度动力学模型：$y = -0.1598x^2 + 0.1716x + 4.515$（$R^2 = 0.7810$）

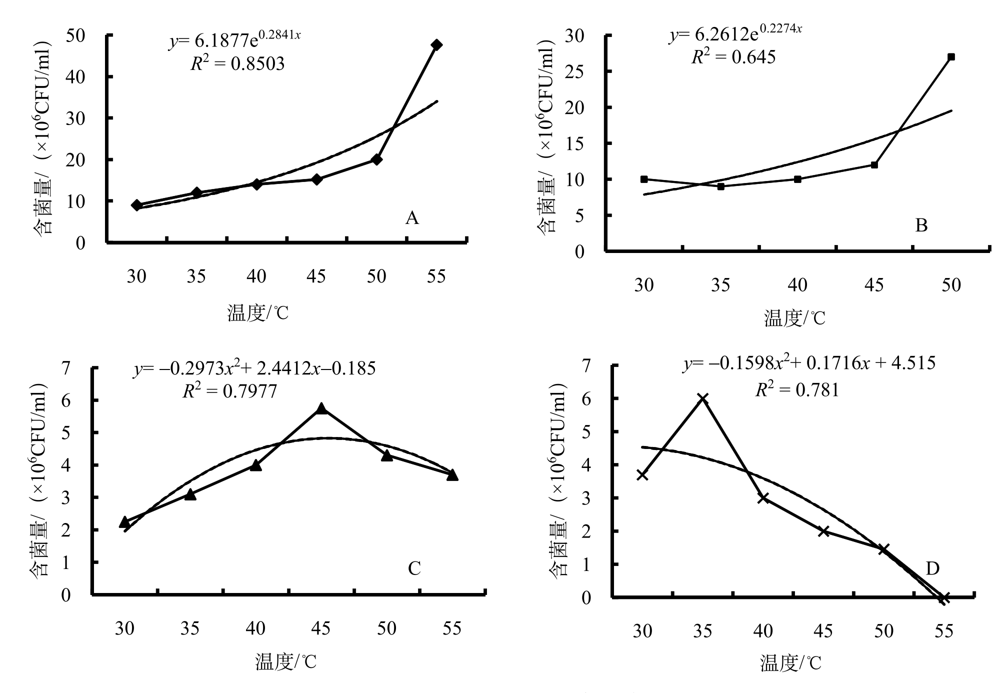


图 4-21　芽胞杆菌温度动力学

A. 枯草芽胞杆菌 B-6-6 温度动力学模型；B. 凝结芽胞杆菌 Lp-6 温度动力学模型；C. 左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 温度动力学模型；D. 浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12 温度动力学模型

3. 芽胞杆菌生长时间动力学模型

在 30℃条件下，芽胞杆菌单独培养，各菌株生长特性差异很大。枯草芽胞杆菌 B-6-6 有两个生长高峰，即 6h 和 36h，含菌量分别为 5.00×10^7CFU/ml 和 6.25×10^7CFU/ml；凝结芽胞杆菌 Lp-6 的生长高峰在 36h，含菌量达 6.20×10^7CFU/ml；左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11 的生长高峰在 12h，含菌量达 4.00×10^7CFU/ml；浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12 的生长高峰在 12h，含菌量达 2.63×10^7CFU/ml（表 4-17 和图 4-22）。

表 4-17　芽胞杆菌单独培养的生长特性

取样时间/h	菌株生长量/（$\times10^7$ CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
6	5.00	3.00	2.50	2.00
12	0.77	1.10	4.00	2.63
24	2.00	1.40	0.15	0.58
30	3.00	1.40	0.01	0.42
36	6.25	6.20	0.14	0.10
48	0.68	1.20	0.06	0.01

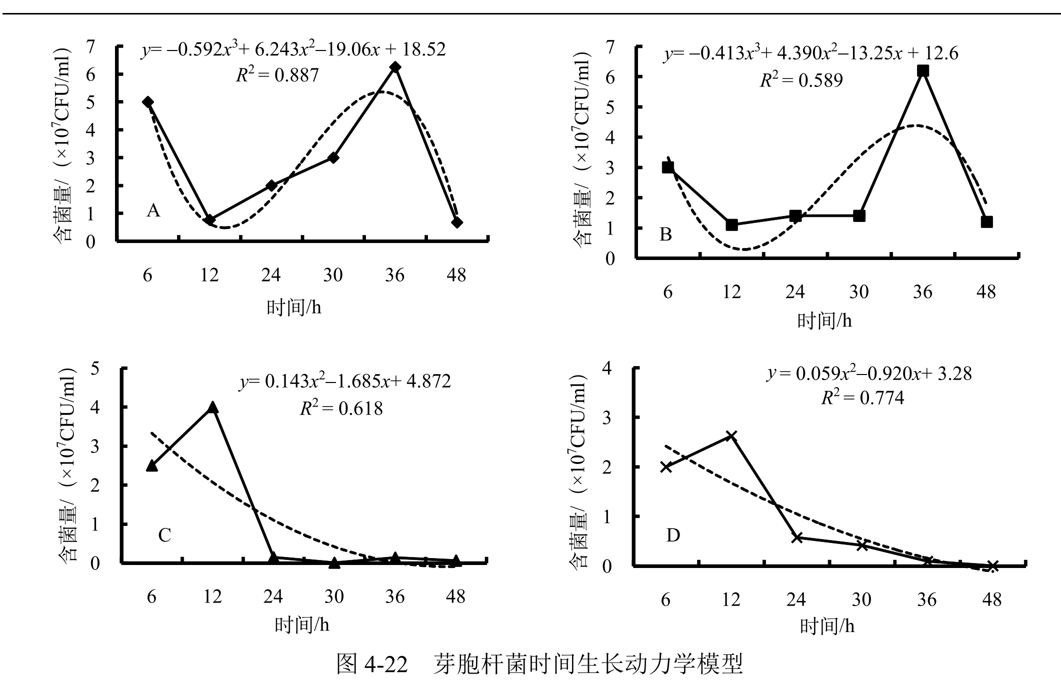


图 4-22　芽孢杆菌时间生长动力学模型

A. 枯草芽孢杆菌 B-6-6 生长时间动力学模型；B. 凝结芽孢杆菌 Lp-6 生长时间动力学模型；C. 左旋乳酸芽孢杆菌 Y-4-11 生长时间动力学模型；D. 浸麻类芽孢杆菌 Y-4-12 生长时间动力学模型

4 种芽孢杆菌的生长动力学模型为：

枯草芽孢杆菌 B-6-6：　$y=-0.5922x^3+6.243x^2-19.065x+18.52$，　$R^2=0.8878$

凝结芽孢杆菌 Lp-6：　$y=-0.4139x^3+4.3905x^2-13.253x+12.6$，　$R^2=0.5892$

左旋乳酸芽孢杆菌 Y-4-11：　$y=0.1432x^2-1.6859x+4.872$，　$R^2=0.6185$

浸麻类芽孢杆菌 Y-4-12：　$y=0.0593x^2-0.9207x+3.28$，　$R^2=0.7744$

第三节　芽孢杆菌种群生长竞争

一、概述

虽然在利用微生物发酵生产酶制剂、抗生素、有机酸、乙醇、氨基酸等方面有过许多研究，但是这些发酵技术基本上都是纯培养技术，而实际上，在自然界中，很难找出单一微生物存在的生态环境。无论是一滴水还是一把土，都是由多种微生物组成的集体环境，它们相互协作，共同完成了各种复杂的物质和能量代谢。据目前已有的研究估计，在地球上存在的微生物至少有 100 万种，而人类所分离获得的纯种不过 10 万种，做过比较系统研究的不超过 1 万种。由此可见，人类对微生物世界的了解还是很有限的。所以，了解微生物之间的相互关系就显得十分重要，根据目前已有的研究结果，大体可以把微生物分为以下几种关系：①中性同生；②同住；③互惠同生；④共生；⑤竞争；⑥拮抗；⑦寄生。以枯草芽孢杆菌 B-6-6、凝结芽孢杆菌 Lp-6、左旋乳酸芽孢杆菌 Y-4-11 和浸麻类芽孢杆菌 Y-4-12 为例，对两株以上的芽孢杆菌不同组合，进行共培养，研究不同温度、不同时间条件下，菌株生长的竞争情况。

二、芽胞杆菌混合培养生长竞争

1. 芽胞杆菌双菌株混合培养生长竞争

芽胞杆菌双组合菌株 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6、*B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11、*B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12、*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11、*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12、*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 在 30℃温度下的生长竞争能力有所不同（表 4-18 和图 4-23）。

表 4-18　芽胞杆菌双组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6	10.00×10^6	0.60×10^6		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	14.60×10^6		0.45×10^6	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12	16.00×10^6			1.00×10^6
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		2.90×10^6	4.00×10^6	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		1.90×10^6		0.93×10^6
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans*Y-4-12			1.08×10^6	0.60×10^6

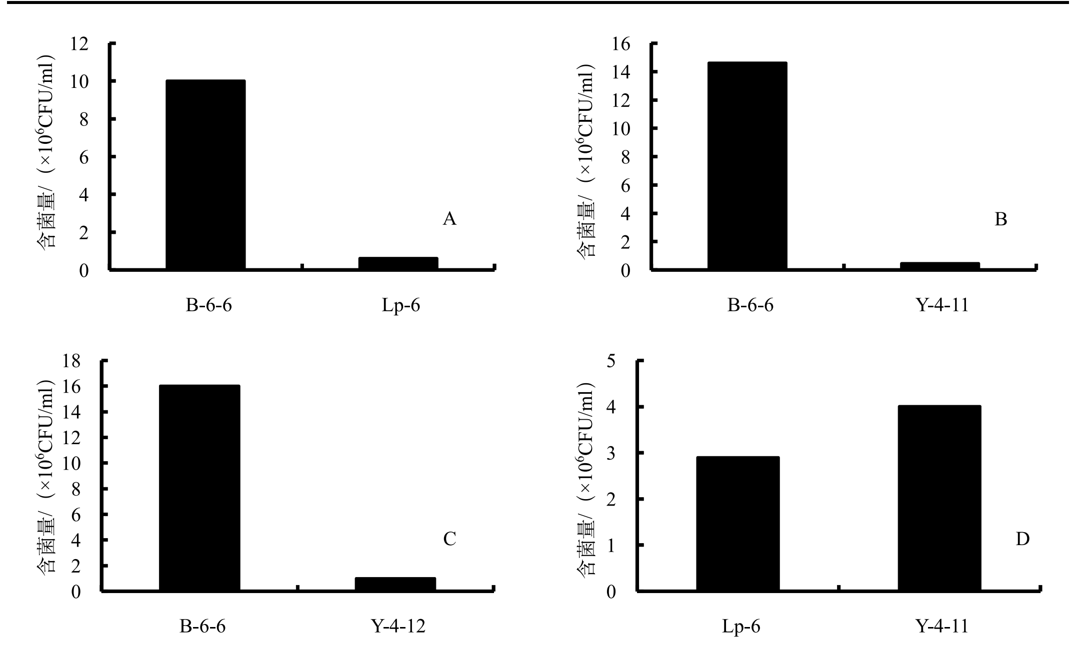


图 4-23　芽胞杆菌双组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力

A. 芽胞杆菌双组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 在 30℃温度下的生长竞争能力；B. 芽胞杆菌双组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 在 30℃温度下的生长竞争能力；C. 芽胞杆菌双组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 在 30℃温度下的生长竞争能力；D. 芽胞杆菌双组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 在 30℃温度下的生长竞争能力；E. 芽胞杆菌双组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 在 30℃温度下的生长竞争能力；F. 芽胞杆菌双组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 在 30℃温度下的生长竞争能力

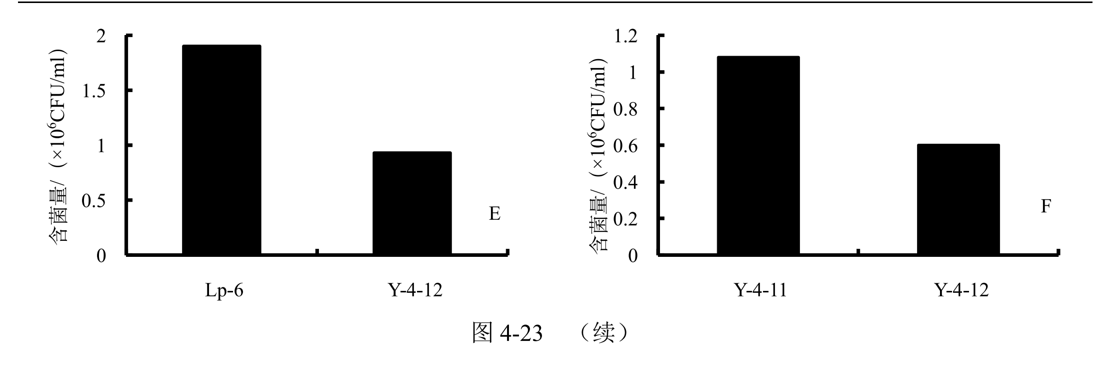


图 4-23　（续）

结果表明：1）组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量为 10×10^6CFU/ml，与其单独培养时的生长能力差不多，是 *B. coagulans* Lp-6 的 16.7 倍，说明在 30℃培养下，菌株 *B. subtilis* B-6-6 是优势菌，它的生长会抑制菌株 *B. coagulans* Lp-6 的生长（图 4-23A）。

2）组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量为 14.6×10^6CFU/ml，比其单独培养时增长了 1.7 倍，是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 32.4 倍，说明在 30℃培养下，菌株 *B. subtilis* B-6-6 是优势菌，它的生长会抑制菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 的生长，同时，菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 的存在会促进菌株 *B. subtilis* B-6-6 的生长（图 4-23B）。

3）组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量为 16×10^6CFU/ml，比其单独培养时增长了约 2 倍，是 *P. macerans* Y-4-12 的 16 倍，说明在 30℃培养下，菌株 *B. subtilis* B-6-6 是优势菌，它的生长会抑制菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长，同时菌株 *P. macerans* Y-4-12 的存在会促进菌株 *B. subtilis* B-6-6 的生长（图 4-23C）。

4）组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，两个菌的生长量相当，前者为 2.9×10^6CFU/ml，后者为 4×10^6CFU/ml，分别与它们单独培养时相当，说明，两个菌株混合培养时互不干扰（图 4-23D）。

5）组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，两个菌的生长量前者为 1.9×10^6CFU/ml，后者为 0.93×10^6CFU/ml，前者与其单独培养时数量相当，后者比其单独培养时数量下降许多，说明混合培养中，菌株 *B. coagulans* Lp-6 不受菌株 *P. macerans* Y-4-12 的影响，反而会抑制菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长（图 4-23E）。

6）组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，两个菌的生长量前者为 1.08×10^6CFU/ml，后者为 0.6×10^6CFU/ml，前者与其单独培养时数量相当，后者比其单独培养时数量下降许多，说明混合培养中，菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 不受菌株 *P. macerans* Y-4-12 的影响，反而会抑制菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长（图 4-23F）。

综上所述，芽胞杆菌双组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6、*B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11、*B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12、*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11、*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12、*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 在 30℃温度下的生长竞争能力分为 3 种类型，①A 抑制 B 型；②B 促

进 A 生长型；③A 和 B 互不干扰型；④A 和 B 互相干扰型。

2. 芽胞杆菌 3 个菌株混合培养生长竞争

芽胞杆菌多组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11、*B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12、*B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12、*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 在 30℃温度下的生长竞争能力不同（表 4-19 和图 4-24）。

表 4-19　芽胞杆菌多组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	3.00×10^6	0.10×10^6	1.00×10^6	
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12	10.60×10^6	0.20×10^6		0.50×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	9.00×10^6		0.60×10^6	0.50×10^6
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		2.80×10^6	1.60×10^6	6.50×10^6

图 4-24　芽胞杆菌三菌株组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力

A. 芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 三组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力；B. 芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 三组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力；C. 芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 三组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力；D. 芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 三组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力

实验结果表明：1）组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，

B. subtilis B-6-6 菌量（3×10^6CFU/ml）>*B. laevolacticus* Y-4-11（1×10^6CFU/ml ）>*B. coagulans* Lp-6（0.1×10^6CFU/ml）；在单独培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 的数量为 9×10^6CFU/ml、菌株 *B. coagulans* Lp-6 的数量为 10×10^6CFU/ml、菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 的数量为 2.25×10^6CFU/ml；在 3 个菌株混合培养中，各菌株的数量都极显著地下降，表明菌株间互相影响很大（图 4-24A）。

2）组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌量（10.6×10^6CFU/ml）>*P. macerans* Y-4-12（0.5×10^6CFU/ml）>*B. coagulans* Lp-6（0.2×10^6CFU/ml）；在单独培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 的数量为 9×10^6CFU/ml、菌株 *B. coagulans* Lp-6 的数量为 10×10^6CFU/ml、*P. macerans* Y-4-12 的数量为 3.7×10^6CFU/ml；在三个菌株混合培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 的数量和单独培养相近，其他两个菌株的数量都极显著地下降，表明菌株 *B. subtilis* B-6-6 的生长对其他两个菌株产生了极大的抑制作用（图 4-24B）。

3）组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌量（9×10^6CFU/ml）>*B. laevolacticus* Y-4-11（0.6×10^6CFU/ml）>*P. macerans* Y-4-12（0.5×10^6CFU/ml）；在单独培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 的数量为 9×10^6CFU/ml、菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 的数量为 2.25×10^6CFU/ml、*P. macerans* Y-4-12 的数量为 3.7×10^6CFU/ml；在混合培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 的数量和单独培养时相近，而 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌株与单独培养比较显著地减少；混合培养中菌株 *B. subtilis* B-6-6 菌的含量约是其他两个的 10 倍，表明菌株 *B. subtilis* B-6-6 的生长对其他两个菌株产生了极大的抑制作用（图 4-24C）。

4)组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*P. macerans* Y-4-12 菌量（6.5×10^6CFU/ml）> *B. coagulans* Lp-6（2.8×10^6CFU/ml） > *B. laevolacticus* Y-4-11（1.6×10^6CFU/ml）;在单独培养中，菌株 *B. coagulans* Lp-6 的数量为 10×10^6CFU/ml、菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 的数量为 2.25×10^6CFU/ml、*P. macerans* Y-4-12 的数量为 3.7×10^6CFU/ml；在混合培养中，菌株 *B. coagulans* Lp-6 和 *B. laevolacticus* Y-4-11 的菌量比单独培养时显著下降，而菌株 *P. macerans* Y-4-12 则比单独培养菌量显著增加，表明与菌株 *B. coagulans* Lp-6 和 *B. laevolacticus* Y-4-11 的混合培养，能促进菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长，而菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长能抑制其他两个菌株的生长（图 4-24D）。

3. 芽胞杆菌 4 个菌株混合培养生长竞争

芽胞杆菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/ *P. macerans* Y-4-12 混合培养中，菌株 *B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 菌量相当，都比它们单独培养时菌量低，菌株 *B. subtilis* B-6-6 的含量约是它们的 10 倍，比单独培养时菌量高，说明菌株 *B. subtilis* B-6-6 的生长会抑制菌株 *B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 的生长，而后三者会促进前者的生长（图 4-25）。

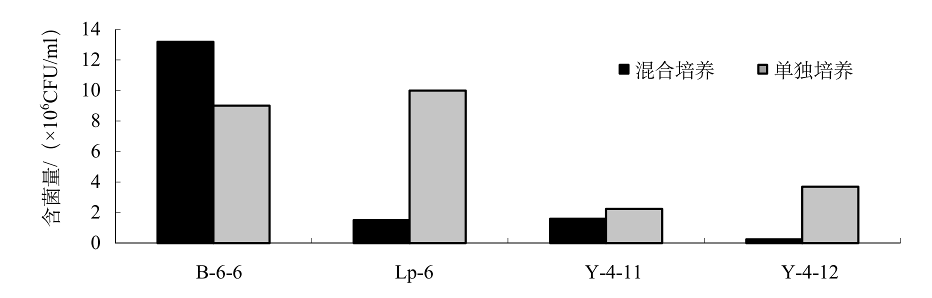


图 4-25　芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 四菌株组合培养在 30℃温度下的生长竞争能力

三、温度对芽胞杆菌混合培养生长竞争的影响

1. 芽胞杆菌在 35℃温度下混合培养生长竞争

在 35℃培养下的各菌株间的竞争生长关系如下（表 4-20）。

表 4-20　35℃温度下芽胞杆菌 4 个菌株等量混合培养的生长竞争特性

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
1）*B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6	1.00×10^7	6.00×10^5		
2）*B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	1.46×10^7		4.50×10^5	
3）*B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12	1.60×10^7			1.00×10^6
4）*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		2.90×10^6	4.00×10^6	
5）*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		1.90×10^6		9.30×10^5
6）*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			1.08×10^6	6.00×10^5
7）*B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	3.00×10^6	1.00×10^5	1.00×10^6	
8）*B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12	1.06×10^7	2.00×10^5		5.00×10^5
9）*B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	9.00×10^6		6.00×10^5	5.00×10^5
10）*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		2.80×10^6	1.60×10^6	6.50×10^6
11）*B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.32×10^7	1.50×10^6	1.60×10^6	2.50×10^5

1）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 的 16.7 倍。

2）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 32.4 倍。

3）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 16 倍。

4）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，两个菌的生长量相当。

5）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 2 倍。

6）双菌组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 1.8 倍。

7）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，菌量 *B. coagulans* Lp-6 和 *B. laevolacticus* Y-4-11 两个菌的生长量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量约是它们的 3 倍。

8）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，菌量 *B. coagulans* Lp-6 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的生长量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量约是它们的 15 倍。

9）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的生长量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量约是它们的 8.2 倍。

10）三菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，各菌量相当。

11）四菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 三个菌量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量约是它们的 10 倍。

2. 芽胞杆菌在 45℃温度下混合培养生长竞争

在 45℃培养下各菌株的竞争生长关系如下（表 4-21）。

表 4-21　45℃温度下芽胞杆菌 4 个菌株等量混合培养的生长竞争特性

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
1) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6	6.80×10^{6}	1.50×10^{5}		
2) *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	1.04×10^{7}		2.10×10^{6}	
3) *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12	5.00×10^{6}			1.00×10^{6}
4) *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	2.20×10^{6}		5.20×10^{6}	
5) *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		2.40×10^{6}		1.60×10^{6}
6) *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			1.60×10^{6}	8.00×10^{5}
7) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	3.50×10^{6}	1.60×10^{5}	1.35×10^{6}	
8) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12	1.50×10^{7}	1.00×10^{6}		4.00×10^{5}
9) *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.18×10^{7}		6.00×10^{5}	3.50×10^{5}

续表

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
10) *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		2.50×10^{6}	1.60×10^{6}	1.00×10^{6}
11) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.00×10^{7}	1.20×10^{6}	9.00×10^{5}	5.00×10^{5}

1）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 菌量的 45 倍.

2）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 5 倍。

3）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 5 倍。

4）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，两个菌的生长量相当。

5）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，两个菌的生长量相当。

6）双菌组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 2 倍。

7）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，菌量 *B. coagulans* Lp-6 和 *B. laevolacticus* Y-4-11 两个菌的生长量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量约是它们的 2.3 倍。

8）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 2.5 倍，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 菌量的 15 倍。

9）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的生长量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量约是它们的 1.2 倍。

10）三菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中的各菌量相当。

11）四菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 三个菌量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是它们的 3.8 倍。

3. 芽胞杆菌在 50℃温度下混合培养生长竞争

在 50℃培养下，芽胞杆菌混合生长竞争情况如下（表 4-22）。

表 4-22　50℃温度下芽胞杆菌 4 个菌株等量混合培养的生长竞争特性

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
1) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6	1.60×10^{7}	3.00×10^{6}		
2) *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	1.84×10^{7}		6.50×10^{5}	
3) *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12	1.42×10^{7}			6.00×10^{5}
4) *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		8.00×10^{6}	8.00×10^{6}	
5) *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		1.06×10^{7}		1.00×10^{6}
6) *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			1.30×10^{6}	8.00×10^{5}
7) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	5.00×10^{6}	4.00×10^{5}	1.50×10^{5}	
8) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12	1.1×10^{7}	3.20×10^{6}		4.00×10^{5}
9) *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.30×10^{7}		7.00×10^{5}	3.00×10^{5}
10) *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		9.00×10^{6}	3.00×10^{6}	2.00×10^{6}
11) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.20×10^{7}	2.50×10^{6}	1.00×10^{6}	5.00×10^{5}

1）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 的 5.3 倍。

2）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 28 倍。

3）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 23.7 倍。

4）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，两个菌的生长量相当。

5）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量约是 *P. macerans* Y-4-12 的 10 倍。

6）双菌组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 2.6 倍。

7）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，菌量 *B. coagulans* Lp-6 和 *B. subtilis* B-6-6 两个菌的生长量相当，它们菌的生长量约是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 9 倍。

8）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，菌量 *B. coagulans* Lp-6 和 *B. subtilis* B-6-6 两个菌的生长量相当，它们菌的生长量约是 *P. macerans* Y-4-12 的 35.5 倍。

9）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的生长量相当，而 *B. subtilis* B-6-6 菌的含量约是它们的 13 倍。

10）三菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B.*

laevolacticus Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的生长量相当，而 *B. coagulans* Lp-6 菌的含量约是它们的 1.8 倍。

11）四菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 生长量相当，*B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 菌的生长量相当，是 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 菌量的 9.7 倍。

4. 芽胞杆菌在 55℃温度下混合培养生长竞争

在 55℃培养下，芽胞杆菌混合生长情况如下（表 4-23）。

表 4-23　55℃温度下芽胞杆菌 4 个菌株等量混合培养的生长竞争特性

组合	菌株生长量/（CFU/ml）			
	B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
1) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6	7.50×10^6	4.10×10^6		
2) *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	6.32×10^7		0	
3) *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12	1.50×10^7			0
4) *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		7.20×10^6	2.90×10^6	
5) *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		3.40×10^6		5.00×10^4
6) *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			0	0
7) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11	5.60×10^6	3.40×10^6	0	
8) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12	1.10×10^7	5.80×10^6		0
9) *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.40×10^7		0	0
10) *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		4.30×10^6	0	0
11) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	1.42×10^7	5.60×10^6	0	0

1）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，两个菌的生长量相当；

2）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌生长，其他不长；

3）双菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌生长，其他不长；

4）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量约是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 2.5 倍；

5）双菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量约是 *P. macerans* Y-4-12 的 68 倍；

6）双菌组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，两个菌都不长；

7）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，菌量 *B.*

coagulans Lp-6 和 *B. subtilis* B-6-6 两个菌的生长量相当，*B. laevolacticus* Y-4-11 不长；

8）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，菌量 *B. subtilis* B-6-6 是 *B. coagulans* Lp-6 的 1.9 倍，*P. macerans* Y-4-12 不长；

9）三菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌量约 1.4×10^7CFU/ml，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 不长；

10）三菌组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的含量 4.3×10^6 CFU/ml，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 不长；

11）四菌组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌量是 *B. coagulans* Lp-6 菌量的 2.5 倍，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 不长。

四、芽胞杆菌多菌株混合培养生长特性比较

1. 芽胞杆菌多菌株混合培养生长特性比较

在四菌株混合培养条件下，菌株 *B. subtilis* B-6-6 在 30～55℃温度下，生长量受到的影响不大，含菌量为（10～14.2）$\times10^6$CFU/ml。菌株 *B. coagulans* Lp-6 生长量随着温度的提高而增加，含菌量为（1.2～5.6）$\times10^6$CFU/ml，温度提高有利于该菌在混合条件下的生长。菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 在混合培养的条件下，最佳生长温度为 35℃，生长量达 9×10^6CFU/ml，比其单独培养生长量高 3 倍，温度高于 50℃时，该菌几乎不生长。菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长随温度变化菌量变化不大，在 55℃温度下，菌株不生长（表 4-24）。

表 4-24　芽胞杆菌四菌株组合混合培养的生长特性

组合	培养温度/℃	菌株生长/（$\times10^6$CFU/ml）			
		B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
1) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	30	13.20	1.50	1.60	0.25
2) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	35	10.00	1.20	9.00	0.50
3) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	40	11.00	1.80	2.00	0.50
4) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	45	12.00	2.50	1.00	0.50
5) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	50	12.70	4.20	0.40	0.20
6) *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	55	14.20	5.60	0	0

2. 芽胞杆菌单独培养生长特性比较

芽胞杆菌四菌株组合混合培养的生长曲线与其分别单独培养比较发生了显著的变化，混合培养各菌的数量与其单独培养比较总体下降。菌株 *B. subtilis* B-6-6 生长曲线的变化在于改善了其温度适应性，在 35～55℃温度下都能很好生长（图 4-26）。

菌株 *B. coagulans* Lp-6 生长曲线的变化在于生长最佳温度从单独培养的 50℃变为混合培养的 55℃。菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 生长曲线与其单独培养的比较变化在于最佳生长温度从单独培养的 45℃变为混合培养的 35℃，同时，在最佳温度下（35℃），混合培养菌量达 9×10^6CFU/ml，比单独培养高出 3 倍多。菌株 *P. macerans* Y-4-12 生长曲线与其单独培养的比较变化不大，只是整体含菌量严重下降（图 4-27）。

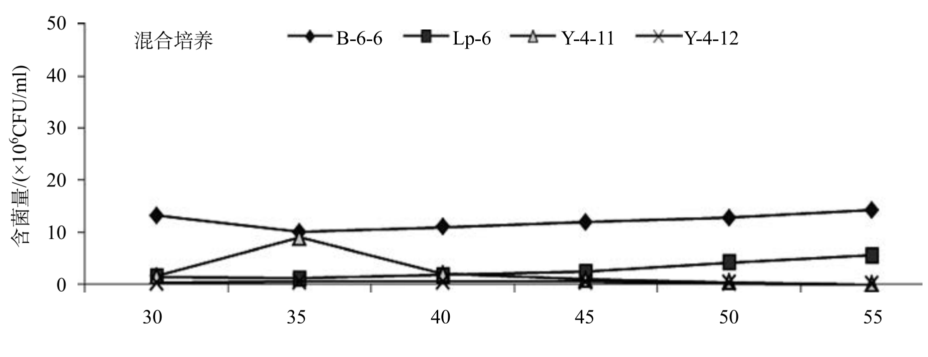


图 4-26　芽胞杆菌四菌株组合混合培养的生长曲线

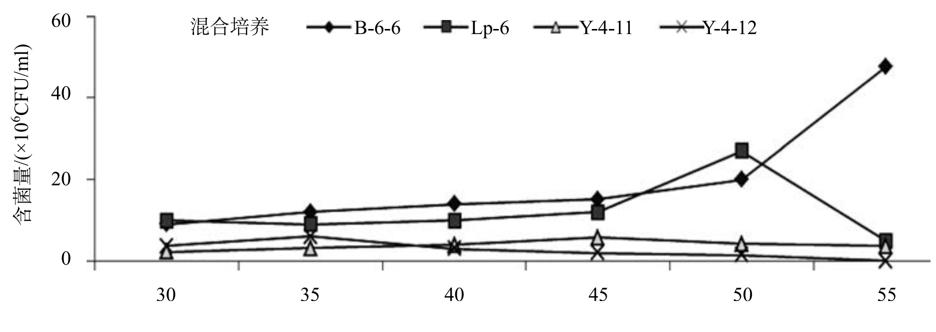


图 4-27　芽胞杆菌四菌株单独培养生长曲线

3. 芽胞杆菌多菌株混合培养与单独培养生长量变化比较

芽胞杆菌四菌株在 30～55℃温度下，组合混合培养和单独培养的生长量变化差异显著；从总体说，在不同温度下，单独培养菌的生长量大于混合培养，仅有菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 在 35℃温度下，混合培养生长量大于单独培养。混合培养对菌株生长的影响大小排序为：枯草芽胞杆菌 B-6-6>凝结芽胞杆菌 Lp-6>左旋乳酸芽胞杆菌 Y-4-11>浸麻类芽胞杆菌 Y-4-12（图 4-28）。

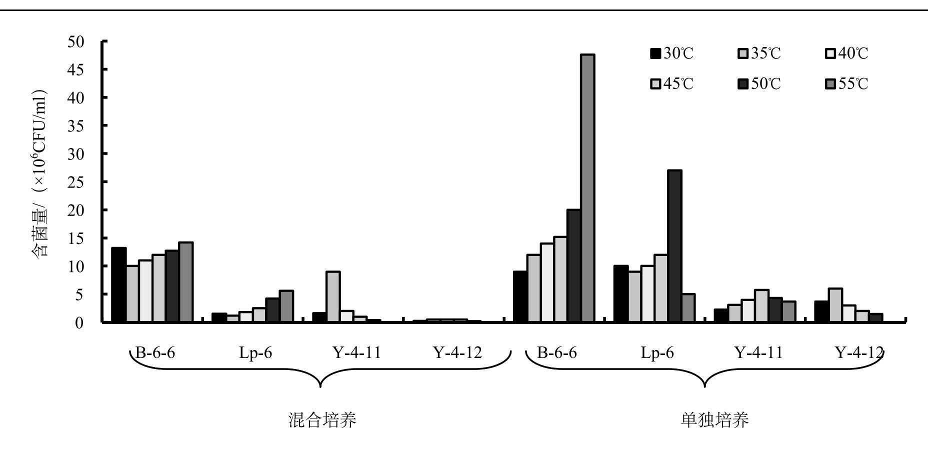


图 4-28　芽胞杆菌四菌株组合混合培养和单独培养的生长量变化比较

五、培养时间对芽胞杆菌生长竞争的影响

1. 培养时间对芽胞杆菌生长的影响

福建省农业科学院农业生物资源研究所微生物研究中心从零排放猪舍基质垫层中分离出 4 种芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6、*B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11、*P. macerans* Y-4-12，将它们作为零排放猪舍发酵的候选菌株，研究中拟将这 4 种菌株进行等量混合培养，不同生长时间取样，调查它们之间的竞争生长关系，为芽胞杆菌的研发提供理论依据。

试验方法如下：材料为从采集的样品中分离出的 4 类芽胞杆菌，即 *B. subtilis* B-6-6、*B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11、*P. macerans* Y-4-12。方法：①将 4 类芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6、*B. coagulans* Lp-6、*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 在 NA 平板上活化（NA：牛肉浸膏 3.0g/L、蛋白胨 5.0g/L、葡萄糖 10.0g/L、琼脂 17.0g/L，pH7.2），30℃培养 24h 后接种于 LB 液体培养基（LB：酵母浸膏 5.0g/L、蛋白胨 10.0g/L、NaCl 10.0g/L，pH7.0）中培养 24h。②将上述 4 类芽胞杆菌按组合方式进行单个菌、2 个菌之间等量组合或 3 个菌之间等量组合或 4 个菌之间等量组合，共 15 个组合。③将上述 15 个组合的菌接种于 LB 液体培养基中培养，每隔 6 个小时取样，涂板于 NA 培养基中，30℃培养 24h 后，观察各类型菌的菌落数。实验结果见表 4-25。

表 4-25　芽胞杆菌 4 个菌株间等量混合不同培养时间的竞争生长

组合	取样时间	菌株生长量/（CFU/ml）			
		B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. subtilis B-6-6	第 6h	5×10^7			
B. coagulans Lp-6			3×10^7		
B. laevolacticus Y-4-11				2.5×10^7	
P. macerans Y-4-12					2×10^7

续表

组合	取样时间	菌株生长量/（CFU/ml）			
		B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6	第6h	1.14×10^7	1.44×10^7		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		3×10^6		1.5×10^7	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12		8×10^6			1.1×10^7
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11			5×10^4	3×10^6	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12			1.7×10^7		2.6×10^7
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12				8.1×10^6	4.9×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1.1×10^5	5×10^4	5×10^3	
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		2.2×10^5	5×10^4		5×10^3
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		3.65×10^6		4.8×10^6	4.8×10^6
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			4.65×10^6	6.4×10^6	1.6×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		3×10^6	2.6×10^6	6.4×10^6	3.2×10^6
B. subtilis B-6-6	第12h	7.7×10^6			
B. coagulans Lp-6			1.1×10^7		
B. laevolacticus Y-4-11				4×10^7	
P. macerans Y-4-12					2.63×10^7
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6		2.95×10^7	1.3×10^6		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		2×10^7		1×10^6	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12		2.4×10^7			2.8×10^7
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11			1.9×10^7	5.5×10^4	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12			2.6×10^6		7.2×10^5
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12				6.5×10^6	1.8×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		2.2×10^7	1×10^6	0	
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		8.6×10^6	5.8×10^6		0
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		9×10^6		1×10^7	9×10^6
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			6.0×10^6	4×10^6	2×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		6×10^5	5×10^4	1×10^7	1.1×10^7

续表

组合	取样时间	菌株生长量/（CFU/ml）			
		B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. subtilis B-6-6	第24h	2×10^7			
B. coagulans Lp-6			1.4×10^7		
B. laevolacticus Y-4-11				1.45×10^6	
P. macerans Y-4-12					5.8×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6		2.5×10^5	1.9×10^6		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1.7×10^7		0	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12		2×10^8			0
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11			6.5×10^6	0	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12			6.5×10^7		0
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12				8.5×10^5	5.5×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1.1×10^6	7.5×10^6	0	
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		2.5×10^5	3.85×10^6		0
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		1.05×10^8		0	0
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			1.65×10^8	1.4×10^6	6×10^5
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		5×10^5	1.3×10^7	5×10^4	5×10^4
B. subtilis B-6-6	第30h	3×10^7			
B. coagulans Lp-6			1.4×10^7		
B. laevolacticus Y-4-11				1×10^5	
P. macerans Y-4-12					4.2×10^6
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6		4×10^6	3×10^7		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1.7×10^7		0	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12		2.5×10^7			0
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11			3×10^7	0	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12			1.12×10^7		0
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12				1.2×10^7	6×10^7
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1×10^5	4.5×10^7		0
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		5×10^4	4.6×10^6		0
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		2.5×10^7		1×10^6	1×10^6

续表

组合	取样时间	菌株生长量/（CFU/ml）			
		B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12	第30h		7×10^{5}	0	0
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12					
B. subtilis B-6-6	第36h	6.25×10^{7}			
B. coagulans Lp-6			6.2×10^{7}		
B. laevolacticus Y-4-11				1.4×10^{6}	
P. macerans Y-4-12					1×10^{6}
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6		8×10^{5}	2×10^{6}		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		2×10^{6}		5×10^{4}	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12		1×10^{6}			0
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11			5×10^{6}	2.9×10^{6}	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12			2.25×10^{6}		5×10^{4}
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12				7.5×10^{4}	2.5×10^{4}
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1.5×10^{5}	2.25×10^{6}	0	
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12		1.25×10^{6}	1.6×10^{7}		0
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		9×10^{5}		1.5×10^{4}	0
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			1.5×10^{6}	0	0
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		2×10^{5}	4.25×10^{6}	1.5×10^{5}	3.5×10^{4}
B. subtilis B-6-6	第48h	6.75×10^{6}			
B. coagulans Lp-6			1.2×10^{7}		
B. laevolacticus Y-4-11				6×10^{5}	
P. macerans Y-4-12					1×10^{5}
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6		2.2×10^{6}	2.25×10^{6}		
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1.25×10^{7}		0	
B. subtilis B-6-6/*P. macerans* Y-4-12					
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11			1.75×10^{7}	0	
B. coagulans Lp-6/*P. macerans* Y-4-12			5.5×10^{6}		1.5×10^{4}
B. laevolacticus Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12				5×10^{5}	5×10^{4}
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11		1×10^{5}	8×10^{5}	0	

续表

组合	取样时间	菌株生长量/（CFU/ml）			
		B. subtilis B-6-6	*B. coagulans* Lp-6	*B. laevolacticus* Y-4-11	*P. macerans* Y-4-12
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12	第48h	1×10^5	1.47×10^7		0
B. subtilis B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		2.2×10^7		0	0
B. coagulans Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12			2.3×10^7	0	0
B. subtilis B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12		0	4.5×10^6	0	0

1）芽胞杆菌 4 个菌株间等量混合培养前 6 个小时长势基本相当；第 12 个小时后，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的长势较强，超越 *B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6；第 30 个小时后，*B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 两个菌的长势增强，而 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 两个菌的长势减弱。

2）芽胞杆菌 4 个菌株长势强弱为：*B. coagulans* Lp-6>*B. subtilis* B-6-6>*B. laevolacticus* Y-4-11>*P. macerans* Y-4-12。

第 6 个小时取样的各菌株间的竞争生长关系如下：①组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 两个菌的生长量相当；②组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量是 *B. subtilis* B-6-6 的 5 倍，说明这两个菌等量混合培养 6 个小时后菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 是优势菌；③组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 两个菌的菌量相当；④组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中 *B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 的 60 倍；⑤组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*P. macerans* Y-4-12 菌的长势略强于 *B. coagulans* Lp-6；⑥组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量约是 *P. macerans* Y-4-12 菌量的 1.65 倍；⑦组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，菌量 *B. subtilis* B-6-6>*B. coagulans* Lp-6>*B. laevolacticus* Y-4-11；⑧组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中的菌量，*B. subtilis* B-6-6>*B. coagulans* Lp-6>*P. macerans* Y-4-12；⑨组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中各个菌的菌量相当；⑩组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中各菌量相差不大；⑪组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中各菌量相差不大（表 4-25）。

第 12 个小时取样的各菌株间的竞争生长关系如下：①组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 的 22.7 倍；②组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. laevolacticus* Y-4-11 的 20 倍；③组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，两个菌的生长量相当；④组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是

B. laevolacticus Y-4-11 的 345 倍；⑤组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *P. macerans* Y-4-12 的 3.6 倍；⑥组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量约是 *P. macerans* Y-4-12 的 3.6 倍；⑦组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量是 *B. coagulans* Lp-6 的 22 倍，且远高于 *B. laevolacticus* Y-4-11；⑧组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 和 *B. coagulans* Lp-6 菌的生长量相当，且远高于 *P. macerans* Y-4-12；⑨组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，各个菌的生长量相当；⑩组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，各个菌的生长量相当；⑪组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* 菌的生长量高于其他两个菌株。

第 24 个小时取样的各菌株的竞争生长关系如下：①组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *B. subtilis* B-6-6 的 7.6 倍；②组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量远高于 *B. laevolacticus* Y-4-11；③组合 *B. subtilis* B-6-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量远高于 *P. macerans* Y-4-12；④组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量远高于 *B. laevolacticus* Y-4-11；⑤组合 *B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量远高于 *P. macerans* Y-4-12 的 3.6 倍；⑥组合 *B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. laevolacticus* Y-4-11 菌的生长量与 *P. macerans* Y-4-12 相当；⑦组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量约是 *B. subtilis* B-6-6 的 7 倍，且远高于 *B. laevolacticus* Y-4-11；⑧组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *B. subtilis* B-6-6 的 15 倍，且远高于 *P. macerans* Y-4-12；⑨组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. subtilis* B-6-6 菌的生长量远高于 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12；⑩组合 *B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中，*B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12 的 82.5 倍；⑪组合 *B. subtilis* B-6-6/*B. coagulans* Lp-6/*B. laevolacticus* Y-4-11/*P. macerans* Y-4-12 中， *B. coagulans* Lp-6 菌的生长量是 *B. subtilis* B-6-6 的 26 倍，且远高于 *B. laevolacticus* Y-4-11 和 *P. macerans* Y-4-12。

第 30 个小时、第 36 个小时、第 48 个小时后各菌株的长势为 *B. coagulans* Lp-6>*B. subtilis* B-6-6>*B. laevolacticus* Y-4-11>*P. macerans* Y-4-12。

2. 培养时间对芽胞杆菌双菌株混合生长竞争的影响

不同培养时间下芽胞杆菌双组合混合培养的生长竞争特性可分为 3 种类型(图 4-29)。

1）交替竞争型，枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6 和凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 等量混合，在 30℃温度下培养，培养 6h，两菌株数量相当；12h 菌株 *B. subtilis* B-6-6 生长达到高峰，而菌株 *B. coagulans* Lp-6 则处于最小值；24h 两菌株生长进入低谷；在 30h 时，菌株 *B. coagulans* Lp-6 生长达高峰，而菌株 *B. subtilis* B-6-6 则处于低峰；36h 后两

菌株数量一起下降。

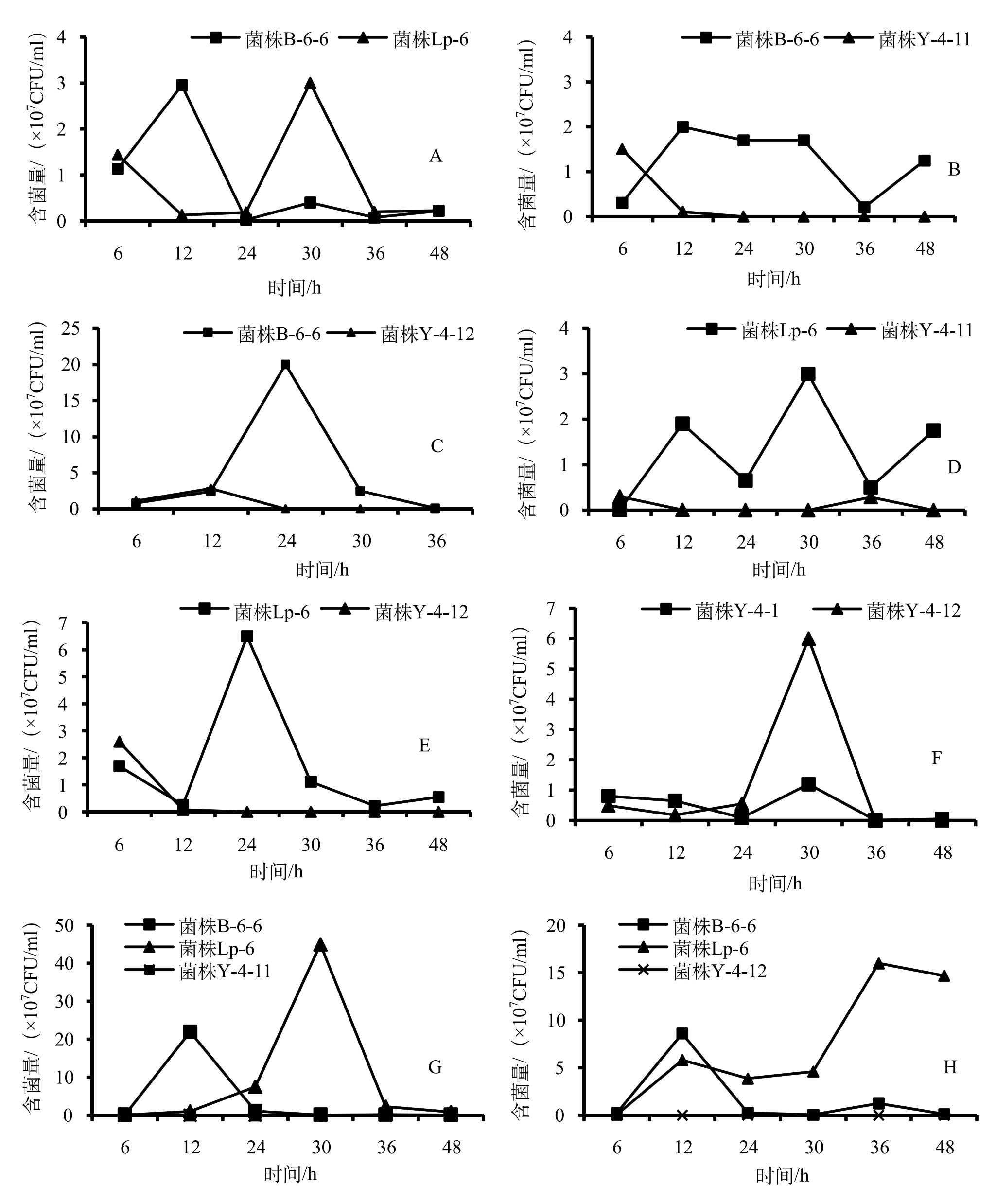


图 4-29 培养时间对芽胞杆菌双菌株混合生长竞争的影响

A.枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6 和凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 生长竞争；B.枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6 和左旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11 生长竞争；C.枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6 和类芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 生长竞争；D.凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 和左旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11 生长竞争；E.凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 和类芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 生长竞争；F. 左旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11 和类芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 生长竞争；G. 枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6、凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* LP-6、左旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11 三组合混合培养的生长竞争特性；H. 枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6、凝结芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6、类芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 三组合混合培养的生长竞争特性；I. 芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6、左旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11、类芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 三组合混合培养的生长竞争特性；J. 芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6、左旋乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11、类芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 三组合混合培养的生长竞争特性

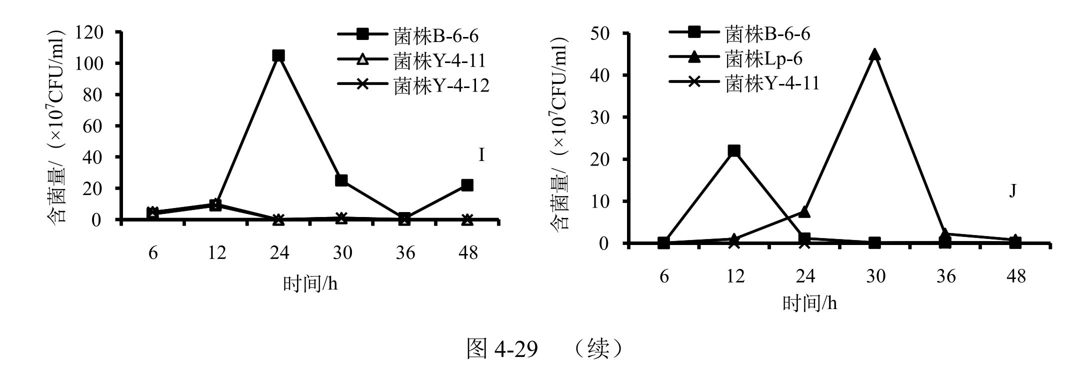


图 4-29　（续）

2）单峰竞争型，表现为两个菌株混合培养，其中一个优势菌株逐步生长，形成一个高峰，抑制另外一个菌株的生长。菌株 *B. subtilis* B-6-6 与菌株 *P. macerans* Y-4-12 混合培养，24h 菌株 *B. subtilis* B-6-6 生长达高峰，抑制另一菌株 *P. macerans* Y-4-12，使其处于低谷状态，整个生长过程只出现一次高峰。

3）多峰竞争型，表现为两个菌株混合培养，其中一个优势菌株逐步生长，形成多个高峰，抑制另外一个菌株的生长。菌株 *B. subtilis* B-6-6 和菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 混合培养，菌株 *B. subtilis* B-6-6 抑制菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 生长，分别在 12h、24h、30h、48h 出现生长高峰。同样，菌株 *B. coagulans* Lp-6 与菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 混合培养，菌株 *B. coagulans* Lp-6 分别在 12h、30h、48h 出现生长高峰，抑制菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 的生长。

3. 培养时间对芽胞杆菌四菌株混合生长竞争的影响

四个菌株等量混合培养，其中两个菌株在培养的不同时期交替地成为优势菌株，形成两个竞争峰。在 12h 时，芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11 和菌株 *P. macerans*Y-4-12 生长达峰值，抑制了其他两个菌株的生长，成为优势菌株。在 24h 时，芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 的生长达峰值，形成优势菌株，抑制其他三个菌株的生长。之后，芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 的生长一直保持优势，抑制了其他菌株的生长（图 4-30）。

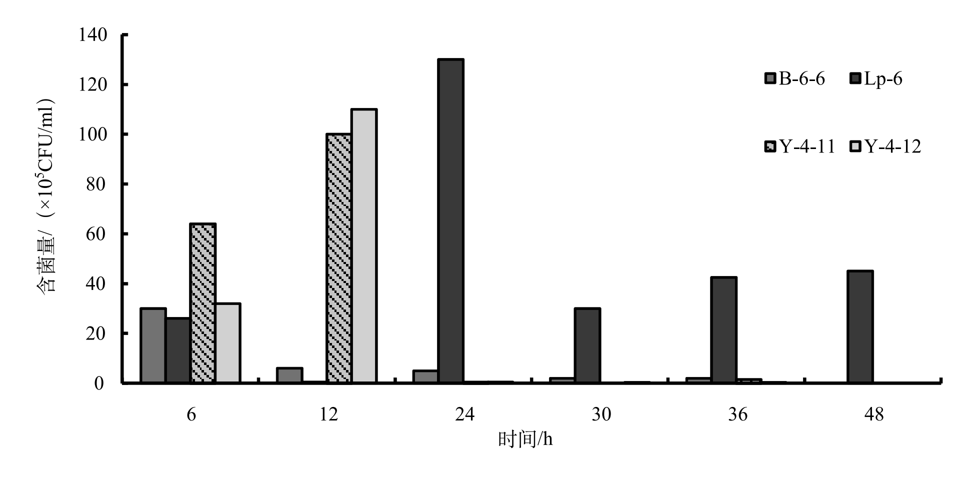


图 4-30　不同培养时间下芽胞杆菌混合培养生长特性

4. 芽胞杆菌混合培养与单独培养不同时间生长特性的比较

不同培养时间下，芽胞杆菌混合培养与单独培养生长特性变化极为显著。总体上说，菌株生长曲线变化趋势发生了改变。菌株 *B. subtilis* B-6-6 混合培养与单独培养比较，在混合培养中，菌株受到极大的抑制，生长峰值不明显，而在单独培养过程中，其生长峰值出现在 6h 和 36h；菌株 *B. coagulans* Lp-6 在混合培养和单独培养中，也有很大差异，主要表现为在混合培养中菌株的峰值在 36h，而在单独培养中菌株的峰值在 24h；菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 在混合培养和单独培养中，生长曲线的形状相似，在 12h 生长达峰值，只是混合培养菌株数量较单独培养相差两个数量级（10^2）。菌株 *P. macerans* Y-4-12 在混合培养和单独培养中，生长曲线的形状相似，在 12h 生长达峰值，只是混合培养菌株数量较单独培养相差 2 个数量级（10^2）（图 4-31）。

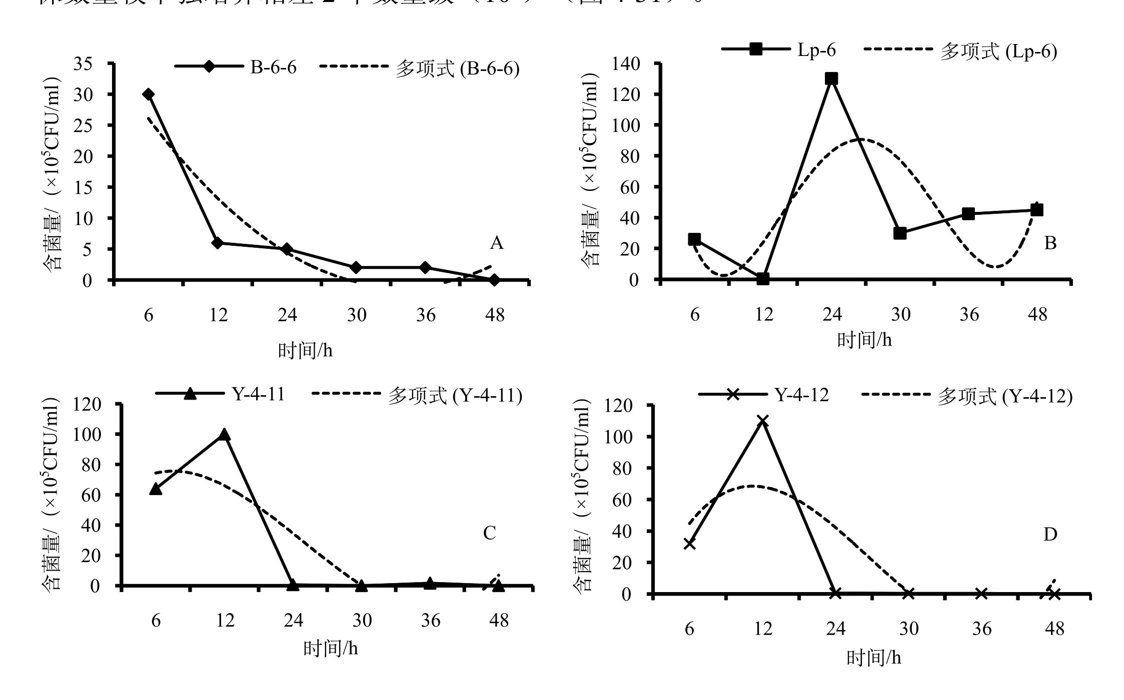


图 4-31 芽胞杆菌单独培养生长特性

A. 芽胞杆菌 *B. subtilis* B-6-6 单独培养生长特性；B. 芽胞杆菌 *B. coagulans* Lp-6 单独培养生长特性；C. 芽胞杆菌 *B. laevolacticus* Y-4-11 单独培养生长特性；D. 芽胞杆菌 *P. macerans* Y-4-12 单独培养生长特性

5. 芽胞杆菌混合培养与单独培养不同时间生长数量的比较

混合培养条件下，所有菌株的生长量与它们单独培养时比较小两个数量级（图 4-32）。

值得注意的是，在单独培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 和菌株 *B. coagulans* Lp-6 生长峰值出现在 36h，而在混合培养中，菌株 *B. subtilis* B-6-6 被抑制没有峰值出现，而菌株 *B. coagulans* Lp-6 的峰值前移到 24h；在单独培养和混合培养中，菌株 *B. laevolacticus* Y-4-11 和菌株 *P. macerans* Y-4-12 的生长峰值都在 12h（图 4-32）。表明菌株的特性不

同，其单独培养和混合培养的生长特性也不一样。

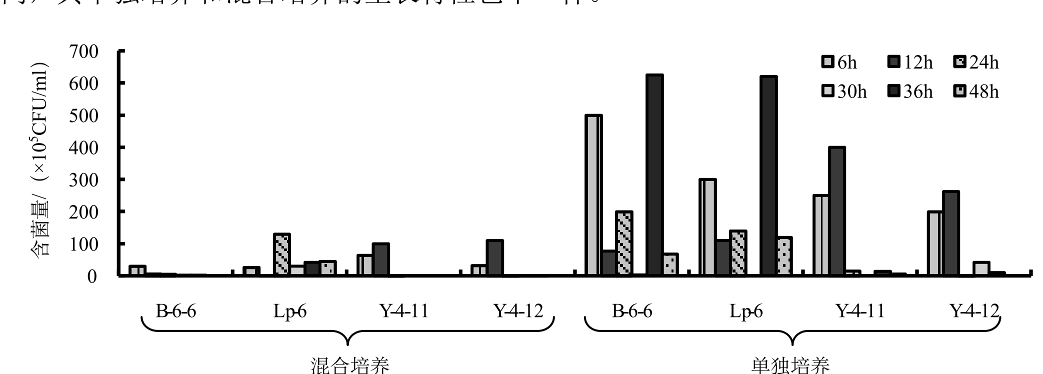


图 4-32　芽胞杆菌混合培养与单独培养不同时间生长数量的比较

第四节　芽胞杆菌种群空间分布型

一、概述

以大栏养猪微生物发酵床基质垫层芽胞杆菌与莫拉氏菌空间格局相互关系研究为例，对芽胞杆菌种群空间分布型进行研究。作者设计了微生物发酵床菜猪大栏养殖猪舍，单体猪舍面积超过 2000m^2，单栏养殖猪的数量超过 1500 头（刘波等，2015）。微生物发酵床大栏养猪技术是利用植物废弃物如谷壳、椰糠等，制作发酵床垫层，接种微生物，猪养殖在垫层上，排出的粪便由微生物分解消纳，原位发酵成有机肥。因此，粪尿无排放，猪舍无臭味，同时，能提高发酵床防控猪病的能力（郑雪芳等，2011）。为研究微生物发酵床基质垫层微生物群落动态，引入脂肪酸生物标记对微生物发酵床微生物群落多样性进行了研究（刘波等，2008）。微生物发酵床有益微生物与病原微生物空间格局相互关系的研究，对于阐明微生物发酵床降解猪粪和抑制病原的机理具有重要意义，然而，这方面的研究未见报道。关于微生物空间分布格局研究主要集中在植物病原上，利用植物病原引起的病害症状，无需分离病原，进行田间调查，研究病害的空间格局。已对一批植物病原的空间格局进行过研究，如小麦纹枯病（邓曹仁和潘远勇，1998）、茄子黄萎病（郭岩和杨文为，1999）、姜瘟病（魏仲军等，2002）、西瓜枯萎病（刘波等，2004）、青花菜黑腐病（汪恩国等，2004）、水稻条纹叶枯病（王华弟等，2007）、白菜黑斑病（刘影等，2008）、桃树细菌性穿孔病（许杰，2009）、枣缩果病（张锋等，2010）、玉米褐斑病（段显德等，2010）、油菜菌核病（朱金良等，2012）、杨树黑斑病（祝继强和鹿兆国，2013）、骏枣疮痂病（陈小飞等，2013）、晚稻细菌性条斑病（李云明等，2014）等。

利用脂肪酸生物标记研究微生物群落有过许多的报道：①细菌往往不含有多个不饱和键的脂肪酸，它含有的主要是链长为奇数的、带支链的、主链上含有环丙基或羟基的脂肪酸，i15:0、a15:0、15:0、i16:0、16:0、16:1ω9、16:1ω7c、i17:0、a17:0、cy:17:0、18:1ω7、cy19:0 为细菌特有，其总和可代表细菌生物量的指标（Kimura and Asakawa，2006; Ohansen

and Olsson，2005; White *et al*.,1979）。②真菌大多含有多个不饱和键，18:2ω6,9 及 18:3ω6 可作为真菌生物量的指标（Frostegård and Bååth，1996; Zelles *et al*., 1995）。③放线菌常在羧基端第十个碳原子上有一个甲基基团，所以 10Me 18:0 代表放线菌指标（Frostegård and Bååth, 1996; Joergensen and Potthoff, 2005）。④G^+细菌含有更多的 anteiso-和 iso-，或其他支链的脂肪酸；G^-菌含有较多的单一不饱和脂肪酸或环脂肪酸（White *et al*., 1979; Vestal and White, 1989; Joergensen and Potthoff, 2005）。作者选择微生物发酵床中的芽胞杆菌和莫拉菌作为益生菌和病原菌的代表，利用特征性脂肪酸生物标记研究其空间格局变化动态的相互关系。脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 存在于所有的芽胞杆菌中，是芽胞杆菌属的标记。在大部分芽胞杆菌种类中，15:0 ANTEISO 含量超过 30%，如深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）15:0 ANTEISO 脂肪酸生物标记含量 48.83%、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）40.01%、海洋芽胞杆菌（*B. marinus*）61.97%、巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）42.31%、简单芽胞杆菌（*B. simplex*） 54.97%、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）38.04%、解硫胺素类芽胞杆菌（*P. thiaminolyticus*）43.6%等（刘波等，2010），选择 15:0 ANTEISO 作为芽胞杆菌种群的指示生物标记。脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL 是莫拉菌属（*Moraxella*）的特征性标记（卢舒娴，2011）。莫拉菌属于革兰氏阴性、短小、需氧、无色素的杆菌或球杆菌。莫拉菌属主要种类有 7 种，包括了腔隙莫拉菌（*M. lacunate*）、非液化莫拉菌（*M. nonliquefaciens*）、奥斯陆莫拉菌（*M. osloensis*）、苯丙酮酸莫拉菌（*M. phenylpyruvica*）、亚特兰大莫拉菌（*M. atlantae*）、狗莫拉菌（*M. canis*）和林肯莫拉菌（*M. lincolnii*），是引起人畜呼吸道病害的主要病原，选择 16:0 N ALCOHOL 作为莫拉菌种群的指示生物标记。对 900m^2 的微生物发酵床养猪大栏进行空间采样，测定样方中的 15:0 ANTEISO 脂肪酸生物标记指示的芽胞杆菌种群和 16:0 N ALCOHOL 脂肪酸生物标记指示的莫拉菌种群，分析其空间格局、空间分布型变化规律，揭示微生物发酵床条件下，益生菌芽胞杆菌和病原菌莫拉菌空间格局的相互关系，为微生物发酵床的作用机理提供科学数据。

二、芽胞杆菌种群空间分布型研究方法

1. 芽胞杆菌采样

样品环境：采集地点为福清武警 8710 部队生产基地微生物发酵床养猪场。采集时间为 2013 年 8～9 月。猪舍空气温度 30～32℃，垫层 20cm 处温度 40～41℃。微生物发酵床长 60m，宽 15m，基质垫层高度 0.8m，配方由谷壳 50％、椰糠 50％组成，用处理菌种兑水稀释 1000 倍，加入基质垫层搅拌，使基质垫层水分保持在 45％，堆制发酵 10d，而后摊平养猪，放入平均体重为 20kg 的小猪 750 头，密度为每头猪 1.2m^2。间隔 1d、30d、60d 天取样一次，共取样 3 个批次。样品的采集（图 4-33）：在 1800m^2 的微生物发酵床养猪大栏半边垫料进行采样，猪栏面积为 60m×15m=900m^2，将猪栏纵向分为 3 栏，横向分为 10 栏，共 30 个小区。采集方法：每个小区在其中间采样一个点，每个采样点直径约 40cm，将垫料上下翻匀，采集 2kg 发酵床垫层，取样待用。

饮　　水　　处										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
取　　食　　台										

图 4-33　大栏养猪微生物发酵床猪舍取样点示意图

2. 微生物发酵床垫料整体脂肪酸分析

脂肪酸（PLFA）提取步骤：①脂肪酸的释放和甲酯化，取 10g 基质垫层于 50ml 离心管中，加入 20ml 0.2mol/L 的 KOH 甲醇溶液，涡旋振荡 5min，并于 37℃水浴温浴 lh，每 10min 涡旋样品一次。②中和溶液 pH：加入 3ml 1.0mol/L 的乙酸溶液，充分摇匀。③脂肪酸的萃取：加入 l0 ml 正己烷，充分摇匀，2000r/min 离心 15min，取上层正己烷相于干净玻璃试管中，吹干，溶剂挥发。④在玻璃试管中加入 0.6ml 体积比为 1∶1 的正己烷：甲基丁基醚溶液，充分溶解 3～5min，转入 GC 小瓶，用于脂肪酸测定。样品脂肪酸成分检测及成分分析参照 Frostegård 和 Bååth（1996）。脂肪酸成分检测：用微生物自动分析仪（Sherlock MIS 美国 MIDI 公司生产）分析微生物脂肪酸生物标记，在下述气相色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本：二阶程序升高柱温，170℃起始，经 5℃/min 升至 260℃，而后经 40℃/min 升至 310℃，维持 90s；汽化室温度 250℃，检测器温度 300℃；载气为 H_2（2ml/min），尾吹气为 N_2（30ml/min），柱前压 10.00 Psi（1Psi=6.895kPa），进样量 1μl。脂肪酸成分分析：根据系统各组分保留时间计算等链长（ECl）值确定目标组分的存在，采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量。选择脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 作为芽胞杆菌种群（*Bacillus* sp.）的特征标记（刘波，2011），选择脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL 作为莫拉菌种群（*Moraxella* sp.）的特征性标记（卢淑贤等，2011）。

3. 微生物空间格局分析方法

利用 15:0 ANTEISO 指示芽胞杆菌和 16:0 N ALCOHOL 指示莫拉菌，统计测定的脂肪酸生物标记平均数，建立空间格局数量色差标准级别，1 级黑色，高于平均数 10%以上，2 级为灰色，在平均数左右，3 级为白色，低于平均数 10%以下。将脂肪酸测定值在空间样点上标注，并用色差表示。

4. 微生物空间分布聚集度指标

根据微生物不同分布型进行调查取样，分析微生物种群空间分布型的聚集度指标，用于判断种群的空间分布型，对种群群体行为、种群扩散型的时间序列变化等提供有用的信息。聚集度测定的指标如下。

1）平均拥挤度 m*（Lloyd，1967）。通俗地讲，平均拥挤度表示微生物个体在一个样方中的平均邻居数，它反映了样方内微生物个体的拥挤程度。公式如下，

$$m^* = \frac{\sum_{j=1}^{\theta} x_j(x_j - 1)}{\sum_{j=1}^{\theta} x_j} = m + \frac{S^2}{m} - 1$$

式中，x_j 为第 j 个样方的个体数；θ 为样方总数；m 为平均密度；S^2 为样本方差。

2）丛生指标 I。当 $I<0$ 时为均匀分布；当 $I=0$ 时为随机分布；当 $I>0$ 时为聚集分布（于传宗等，2008）。公式为

$$I = \frac{S^2}{m} - 1$$

3）聚块性指标 m^*/m。在 Moore（1954）的 m*指标的基础上，Lloyd（1967）提出了 m^*/m 指标，即平均拥挤度与其平均值的比值，即当 $m^*/m<1$ 时为均匀分布；当 $m^*/m=1$ 时为随机分布；当 $m^*/m>1$ 时为聚集分布。

4）C_A 指标。Kuno（1968）最早提出并认为，当 $C_A<0$ 时为均匀分布；当 $C_A=0$ 时为随机分布；当 $C_A>0$ 时为聚集分布。公式为

$$C_A = \left(\frac{S^2}{m} - 1\right) / m$$

5）扩散系数 C。该指标 $C=S^2/m$ 用于检验种群是否偏离随机型。当 $C<1$ 时为均匀分布；当 $C=1$ 时为随机分布；当 $C>1$ 时为聚集分布。

6）负二项分布 K指标。在负二项分布中，$K=m^2/(S^2-m)$。当 $K<0$ 时为均匀分布；当 $K\to+\infty$时为随机分布（实际检测中 $K>8$ 时为随机分布）；当 $K>0$ 时为聚集分布。

7）m^*-m 回归分析法。Iwao（1968，1971，1976）建立了如下 m^*-m 回归式，用于研究 m*与平均值之间的相关关系。式中表示分布的基本成分按大小分布的平均拥挤度：当 $\alpha=0$ 时，分布的基本成分为单个个体；当 $\alpha>0$ 时，个体间相互吸引，分布的基本成分为个体群；当 $\alpha<0$ 时，个体之间相互排斥，为基本成分的空间分布图式。当 $\beta<1$ 时，为均匀分布；当 $\beta=1$ 时，为随机分布，当 $\beta>1$ 时，为聚集分布。公式为

$$m^* = \alpha + \beta \mathrm{m}$$

8）幂法则。Taylor（1961）在大量生物种群资料的统计分析中，发现样本平均数与方差的对数值之间存在着以下很有意义的回归关系：$\lg S^2 = \lg a + b\lg m$，即乘幂函数关系 $S^2=am^b$，a 为取样统计因素；b 为聚集度指标，反映物种的特定属性。当 $a>1$，$b>1$ 时为聚集分布，聚集强度随种群密度升高而增加；$a>1$，$b=1$ 时也为聚集分布，但聚集强度不

因种群密度的改变而变化；a=1，b=1 时为随机分布；a<1，b<1 时为均匀分布，种群密度越大，分布越均匀。

三、芽胞杆菌与莫拉菌特征脂肪酸生物标记测定

芽胞杆菌和莫拉菌特征脂肪酸生物标记测定结构见表 4-26。从总体来看，16:0 N ALCOHOL 指示的莫拉菌含量低于 15:0 ANTEISO 芽胞杆菌。芽胞杆菌 1d、30d、60d 取样数量的总和分别为 1 846 169、4 069 372、1 862 995，是莫拉菌同期的 4.4 倍、7.0 倍、37.4 倍。两个菌的高峰都出现在 30d 采样日，特别在 60d 取样时，莫拉菌在 30 个样本中有 19 个样本未检测到，总和下降为 1d 取样的 12%，表明微生物发酵床对莫拉菌有强烈的抑制作用。

表 4-26　莫拉菌和芽胞杆菌特征脂肪酸生物标记测定

坐标	芽胞杆菌脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO			莫拉菌脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL		
	1d	30d	60d	1d	30d	60d
1，1	27 080	202 401	59 642	13 786	46 145	8 367
1，2	115 520	12 998	48 386	25 103	4 866	0
1，3	70 552	186 580	33 850	16 647	23 405	908
1，4	27 340	159 222	63 703	5 033	17 614	0
1，5	18 236	168 930	47 653	3 159	16 285	0
1，6	85 052	122 081	74 011	19 148	0	0
1，7	123 304	137 047	82 530	56 741	17 388	8 046
1，8	74 249	167 623	61 498	12 266	28 738	0
1，9	105 549	162 967	68 828	19 230	26 580	0
1，10	27 884	127 017	49 125	4 891	10 021	0
2，1	61 611	157 657	75 326	17 886	22 766	5 720
2，2	66 712	150 284	23 592	14 546	16 760	0
2，3	50 364	182 184	69 703	5 929	17 091	0
2，4	38 269	173 258	50 597	11 398	38 385	0
2，5	42 500	86 044	55 918	6 335	9 678	0
2，6	85 851	99 615	77 128	25 671	18 332	0
2，7	55 508	96 239	91 957	12 430	0	0
2，8	64 587	163 999	43 904	10 637	19 766	2 981
2，9	64 800	168 955	74 071	8 831	8 134	0
2，10	68 575	167 130	32 215	16 130	29 292	1 885
2，1	46 722	123 090	67 333	12 512	19 427	4 269
3，2	57 439	27 254	62 919	7 333	3 270	4 710
3，3	33 168	243 229	92 750	4 188	56 963	4 396
3，4	11 913	170 869	51 480	2 015	63 530	0

续表

坐标	芽胞杆菌脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO			莫拉菌脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL		
	1d	30d	60d	1d	30d	60d
3，5	77 020	145 464	73 078	30 427	0	0
3，6	94 628	23 462	98 088	20 015	1 890	0
3，7	79 230	113 271	53 568	11 049	35 847	2 958
3，8	44 303	151 908	68 410	5 574	13 387	5 615
3，9	55 370	122 963	57 406	3 704	11 282	0
3，10	72 833	55 631	54 326	12 770	3 532	0
总计	1 846 169	4 069 372	1 862 995	415 384	580 374	49 855

四、芽胞杆菌与莫拉菌脂肪酸生物标记空间格局

脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 指示的芽胞杆菌数值见图 4-34。3 次采样样点脂肪酸生物标记的平均值为 86 428.18，10%的平均值为 8642，那么空间格局的色差级别为 1 级值>95 070.18，2 级为 77 786.18～95 070.18，3 级<77 786.18。分析结果可以看出，在第一次取样（1d），芽胞杆菌达 1 级数量样点有 3 个，2 级数量样点有 4 个，3 级数量样点有 23 个，样点平均值 61 538.96；第二次取样（30d），芽胞杆菌种群数量明显增加，1 级数量样点有 25 个，2 级数量样点 1 个，3 级数量样点 4 个，样点平均值 135 645.73；第三次取样（60d），芽胞杆菌种群数量大幅度下降，1 级数量样点 1 个，2 级数量样点 3 个，3 级数量样点 26 个，样点平均值 62 099.83。

坐标	1	2	3
1.	27 080	61 611	46 722
2.	115 520	66 712	57 439
3.	70 552	50 364	33 168
4.	27 340	38 269	11 913
5.	18 236	42 500	77 020
6.	85 052	85 851	94 628
7.	123 304	55 508	79 230
8.	74 249	64 587	44 303
9.	105 549	64 800	55 370
10.	27 884	68 575	72 833

第1天

坐标	1	2	3
1.	202 401	157 657	123 090
2.	12 998	150 284	27 254
3.	186 580	182 184	243 229
4.	159 222	173 258	170 869
5.	168 930	86 044	145 464
6.	122 081	99 615	23 462
7.	137 047	96 239	113 271
8.	167 623	163 999	151 908
9.	162 967	168 955	122 963
10.	127 017	167 130	55 631

第30天

坐标	1	2	3
1.	59 642	75 326	67 333
2.	48 386	23 592	62 919
3.	33 850	69 703	92 750
4.	63 703	50 597	51 480
5.	47 653	55 918	73 078
6.	74 011	77 128	98 088
7.	82 530	91 957	53 568
8.	61 498	43 904	68 410
9.	68 828	74 071	57 406
10.	49 125	32 215	54 326

第60天

图 4-34　芽胞杆菌指示脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 在各取样点的数值

脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL 指示的莫拉菌数值见图 4-35。3 次采样样点脂肪酸生物标记的平均值为 11 617.92，10%的平均值为 1 167，那么空间格局的色差级别为 1 级值>12 784.92，2 级为 12 784.92～10 450.92，3 级<10 450.92。分析结果可以看出，在第一次取样（1d），莫拉菌达 1 级数量样点有 12 个，2 级数量样点有 7 个，3 级数量样点有 11 个，样点平均值 13 846.13；第二次取样（30d），莫拉菌种群数量明显增加，1 级数量样点有 19 个，2 级数量样点 1 个，3 级数量样点 10 个，样点平均值 19 345.80；

第三次取样（60d），莫拉菌种群数量大幅度下降，1 级数量样点和 2 级数量样点没有，3 级数量样点 30 个，样点平均值 1 661.83。

坐标	1	2	3
1.	13 786	17 886	12 512
2.	25 103	14 546	7 333
3.	16 647	5 929	4 188
4.	5 033	11 398	2 015
5.	3 159	6 335	30 427
6.	19 148	25 671	20 015
7.	56 741	12 430	11 049
8.	12 266	10 637	5 574
9.	19 230	8 831	3 704
10.	4 891	16 130	12 770

第1天

坐标	1	2	3
1.	46 145	22 766	19 427
2.	4 866	16 760	3 270
3.	23 405	17 091	56 963
4.	17 614	38 385	63 530
5.	16 285	9 678	0
6.	0	18 332	1 890
7.	17 388	0	35 847
8.	28 738	19 766	13 387
9.	26 580	8 134	11 282
10.	10 021	29 292	3 532

第30天

坐标	1	2	3
1.	8 367	5 720	4 269
2.	0	0	4 710
3.	908	0	4 396
4.	0	0	0
5.	0	0	0
6.	0	0	0
7.	8 046	0	2 958
8.	0	2 981	5 615
9.	0	0	0
10.	0	1 885	0

第60天

图 4-35　莫拉菌指示脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL 在各取样点的数值

脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 指示芽胞杆菌和脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL 指示莫拉菌种群数量动态见图 4-36。芽胞杆菌种群数量动态呈抛物线，方程为 $y = -2\times10^6x^2 + 9\times10^6x - 5\times10^6$，$R^2 = 1.0000$，在 30d 时达高峰，而后下降；莫拉菌种群数量动态呈幂指数，方程为 $y = 2\times10^6e^{-1.06x}$，$R^2 = 0.6342$，随着调查进程，种群数量逐渐降低。

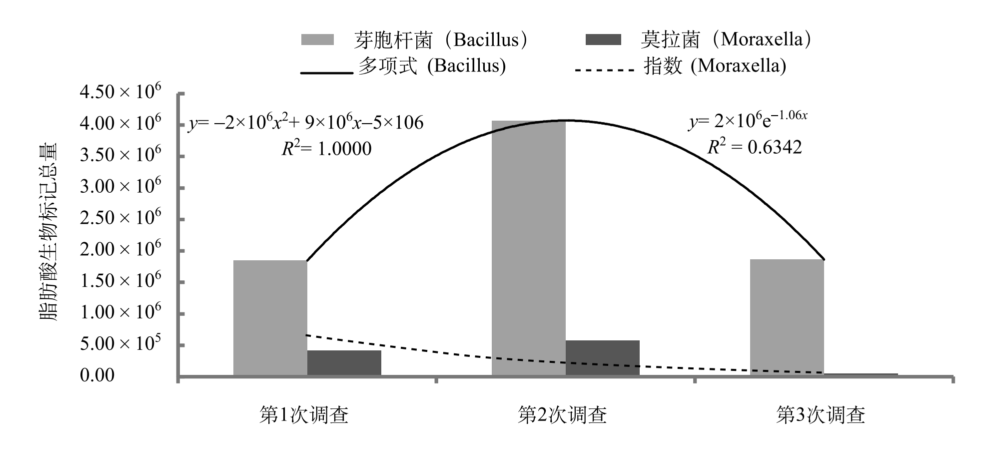


图 4-36　脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 指示芽胞杆菌和脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO 指示莫拉菌种群数量动态

五、芽胞杆菌与莫拉菌种群空间分布型

芽胞杆菌与莫拉菌脂肪酸生物标记空间分布型参数见表 4-27。从表中可以看出，莫拉菌种群平均拥挤度（M^*）要低于芽胞杆菌，1d 时芽胞杆菌平均拥挤度（M^*）是莫拉菌的 3.3 倍，30d 时为 4.8 倍，60d 时为 11.6 倍，随着时间进程，两菌都表现为 30d 时平均拥挤度最高。从聚集度指标看，两菌的 I 指标>1、M^*/M 指标>1、Ca 指标>0、扩散系数 C>1、K>0，两菌的空间分布型皆为聚集分布，只有 60d 取样的芽胞杆菌种群的负二项分布 K>12（→+∞），其空间分布型为随机分布。

表 4-27　芽胞杆菌与莫拉菌脂肪酸生物标记空间分布型参数

种群名称	天数/d	平均拥挤度（M^*）	聚集度指标				负二项分布 K
			I	M^*/M	Ca	C	
莫拉菌 *Moraxella* spp.	1	22 315.86	8 469.73	1.61	0.61	8 470.73	1.64
	30	32 836.85	13 491.05	1.70	0.70	13 492.05	1.43
	60	5 766.97	4 105.14	3.47	2.47	4 106.14	0.41
芽胞杆菌 *Bacillus* spp.	1	73 973.54	12 434.57	1.20	0.20	12 435.57	4.95
	30	156 747.54	21 101.80	1.16	0.16	21 102.80	6.43
	60	67 117.79	5 017.96	1.08	0.08	5 018.96	12.38

莫拉菌种群空间分布型 M^*-M 回归分析，方程为 $M^*=2854.5691+1.5021M$（$R^2=0.9962$），$\alpha=2854.5691>0$，莫拉菌种群个体间相互吸引，分布的基本成分为个体群；$\beta=1.5021>1$，为聚集分布。莫拉菌种群空间分布型 Taylor 幂法则方程 lg（v）=2.206 48+1.433 70*lg（M）（$R^2=0.9964$），$b=1.433\ 70>1$，为聚集分布。芽胞杆菌种群空间分布型 M^*-M 回归分析，方程为 $M^*=-1586.4454+1.1670M$（$R^2=0.9972$），$\alpha=-1\ 586.445\ 43<0$，个体之间相互排斥为基本成分的空间分布图式；$\beta=1.1670>1$，为聚集分布。芽胞杆菌种群空间分布型 TAYLOR 幂法则方程 lg（v）=−2.042 92+2.240 15lg（M）（$R^2=0.9113$），$b=2.24015>1$，为聚集分布。

六、讨论

脂肪酸生物标记（PLFA）用于微生物种群生态学研究的报道不少，主要集中在对不同特性的生态环境下，用微生物脂肪酸生物标记的变化，标识生态环境的影响。例如，利用 PLFA 分析氮水添加对半干旱地区草原土壤微生物群落结构的交互影响（毕捷等，2012），利用 PLFA 分析水稻根际土壤微生物多样性（刘波等，2010），利用脂肪酸生物标记分析土壤甲胺磷抗性细菌种群特征（刘波等，2009），利用 PLFA 分析入侵紫茎泽兰对土壤微生物群落和理化性质的影响（牛红榜等，2007），杨桃与荔枝根区土壤微生物群落磷脂脂肪酸特征分析（阮传清等，2011），有机肥与化肥配施对烤烟土壤微生物群落 PLFA 动态的影响（唐莉娜等，2008），水旱作物轮作田块土壤中微生物群落结构的 PLFA 法比较分析（徐幼平等，2013），应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响（于树等，2008），不同利用方式下羊草草原土壤生态系统微生物群落结构的 PLFA 分析（邹雨坤等，2011）。未见利用 PLFA 指示微生物种类的空间结构的报道。

刘波等（2008）报道了脂肪酸生物标记（PLFA）用于微生物发酵床基质垫层微生物群落动态的研究，从微生物发酵床垫料中检测出 37 个脂肪酸生物标记，不同的生物标记多样性指数在基质垫层不同层次分布不同，通过基质垫层耗氧细菌和厌氧细菌脂肪酸生物标记含量比值，构建发酵指数 F，作为基质垫层发酵特性的指标，发酵指数 F 越高，表明耗氧细菌起的作用越大，反之，耗氧细菌起的作用越小，生物标记的发酵指数可以

作为研究粪便排泄物的微生物分解过程的指数（刘波等，2008）。未见微生物发酵床 PLFA 指示微生物空间格局的研究。

本研究以微生物发酵床大栏空间（900m^2）为研究对象，利用 15:0 ANTEISO 脂肪酸生物标记指示芽胞杆菌种群和 16:0 N ALCOHOL 脂肪酸生物标记指示莫拉菌种群，分析益生菌芽胞杆菌和病原菌莫拉菌的空间格局、空间分布型、种群多样性指数、生态位宽度和重叠指数变化规律，揭示微生物发酵床条件下，益生菌芽胞杆菌和病原菌莫拉菌空间格局的相互关系。研究结果表明，从芽胞杆菌与莫拉菌脂肪酸生物标记空间格局数量分布可以看出，芽胞杆菌种群数量高于莫拉菌，1d、30d、60d 取样，芽胞杆菌种群数量样方平均值分别比莫拉菌高 4.4 倍、7.7 倍、37.3 倍，表明微生物发酵床芽胞杆菌的存在对莫拉菌有强烈的抑制作用。芽胞杆菌种群平均拥挤度（M^*）要高于莫拉菌，1d、30d、60d 取样，芽胞杆菌平均拥挤度（M^*）分别是莫拉菌的 3.3 倍、4.7 倍、11.6 倍；同时，莫拉菌种群分布的基本成分为个体群，个体间相互吸引，空间扩展的趋势较弱；芽胞杆菌种群个体之间相互排斥为基本成分的空间分布图式，空间扩展的趋势较强。

从空间分布型看，在大部分采样时间内，芽胞杆菌种群与莫拉菌种群空间分布型相似，都为聚集分布，这表明芽胞杆菌的空间分布方式与莫拉菌相同，有利于芽胞杆菌对莫拉菌抑制作用的发挥。只有 60d 取样的芽胞杆菌种群的负二项分布 $K>12$（$\rightarrow +\infty$），其空间分布型为随机分布，此时，在芽胞杆菌种群随机分布型的胁迫下，莫拉菌种群密度已经很低，负二项分布 $K=0.41\rightarrow 0$，接近均匀分布。

第五节　芽胞杆菌种群多样性

一、概述

微生物多样性研究是微生物生态学最重要的研究内容之一。微生物在土壤中普遍存在，对环境条件的变化反应敏捷，它能较早地预测土壤养分及环境质量的变化过程，被认为是最有潜力的敏感性生物指标之一。但土壤微生物的种类庞大，使得有关微生物区系的分析工作十分耗时费力。因此，微生物群落结构的研究主要通过微生物生态学的方法来完成，即通过描述微生物群落的稳定性、微生物群落生态学机理及自然或人为干扰对群落产生的影响，揭示土壤质量与微生物数量和活性之间的关系。利用分子生物学技术和研究策略，揭示自然界各种环境中（尤其是极端环境）微生物多样性的真实水平及其物种组成，是微生物生态学各项研究的基础和核心，是重新认识复杂的微生物世界的开端。土壤微生物群落多样性是指土壤微生物群落的种类和种间差异，微生物群落多样性包括物种多样性、遗传多样性及生理功能多样性等。物种多样性是群落中的微生物种群类型和数量，其中丰度和均度是多样性指数中的两个组成部分，也是多样性分析中最直观、最容易理解的要素。与高等生物相比，不同种群间的遗传物质和基因表达具有很大差异。

二、芽胞杆菌种群多样性研究方法

1. 芽胞杆菌种群采样

样品环境：采集地点为福清武警 8710 部队生产基地微生物发酵床养猪场，采样方法与第四节相同。

2. 微生物种群多样性指数分析

1）Simpson（D）优势度指数（D）。非参数多样性测度由 Simpson （1949）提出，人们称为 Simpson（D）优势度指数（D）的测度。Simpson（D）优势度指数的定义为

$$D = 1 - \sum_{i=1}^{s} P_i^2$$

式中，P_i 为第 i 种在群落中所占比例。严格地说，这个公式只能用于估计无限总体的多样性指数。Pielou（1975）指出，对于有限总体，其多样性指数估计公式为

$$D' = 1 - \sum_{i=1}^{s} \left[\frac{n_i(n_i - 1)}{N(N-1)} \right]$$

式中，n_i 为抽样中第 i 个物种的个体数量；N 为抽样中所有物种的个体总和，s 为物种总数。本系统是按 Pielou（1975）提出的公式计算 Simpson（D）优势度指数的。

2）Shannon-Wiener 多样性指数（H）。计算公式为

$$H' = \sum_{i=1}^{s} P_i Ib(P_i)$$

式中，H 为样本中的信息容量（bit/个体），即种的多样性指数，s 为物种总数，P_i 为第 i 种物种个体数占群落总个体数的比例。严格地讲，Shannon-Wiener 信息指数只能用于随机取样、群落很大且群落中所有的物种已知的情况。但是大多数群落调查并不是这种情况。因而，Pielou（1975）推荐使用更为精确的 Brillouin 指数。

3）Brillouin 指数（H）。按照 Pielou（1975）的观点，许多群落抽样样本应该作为一个集合，而不应作为一个来自很大的生物群落的样本来对待。在任何情形下，群落数据应假定是来自一个有限的集合（collection），且是无放回抽样。因此合适的信息理论测度应是 Brillouin 指数（H'）：

$$H' = \frac{1}{N} Ib\left(\frac{N_!}{n_1 ! \mathrm{n}_2 ! n_3 ! \ldots} \right)$$

式中，n_1 为抽样中第 1 个物种的个体数量，n_2 为抽样中第 2 个物种的个体数量，n_3 为抽样中第 3 个物种的个体数量，以此类推，N 为抽样中所有物种的个体总和。

4）均匀度（E）。均匀度（evenness）计算的通式为

$$E = \frac{D - D_{\min}}{D_{\max} - D_{\min}}$$

式中，D 为多样性指数，$D_{\max}$ 为给定 S 个物种 N 总个体数时多样性指数最大值；$D_{\min}$ 为

给定 S 个物种 N 总个体数时多样性指数最小值。

5）McIntosh 指数（D_{Mc}）。McIntosh（1967）认为，一个群落（集合）可看作 S 维空间的一个点，每一维坐标由一个物种的丰富度（即个体数）表示。该多样性的度量公式为

$$D_{\mathrm{MC}} = \frac{N - \sqrt{\sum_{i=1}^{S} n_i}}{N - \sqrt{N}}$$

式中，n_i 为抽样中第 i 个物种个体数量；N 为抽样中所有物种的个体总和；S 为物种数。

3. 生态位宽度指数和生态位重叠指数计算

1）生态位宽度指数计算。生态位宽度（niche breadth）指数是指生物利用资源多样性的一个测度指标，若现有的资源谱中，仅能利用一小部分资源，则称为狭生态位，而能利用很大部分的则称为广生态位。生态位宽度 Levin 测度（B）为

$$B = \frac{1}{\sum p_j^2}$$

式中，p_j 为利用资源 j 的个体的比例。

2）生态位重叠指数计算。Pianka 测度 O 重叠度指数。Pianka（1973）提出了 Pianka 测度 O。

$$O_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^{n} p_{ij} p_{ik}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} p_{ij} \sum_{i=1}^{n} p_{ik}^2}}$$

式中，O_{jk} 表示种类 k 对种类 j 的生态位重叠；p_{ij}，p_{ik} 等于由种类 j 或种类 k 所利用的整个资源中第 i 种资源所占比例；n 为资源状态总数。

三、芽胞杆菌与莫拉菌种群多样性指数分析

脂肪酸生物标记指示的芽胞杆菌与莫拉菌种群多样性指数见表 4-28。芽胞杆菌种群多样性指数总体上高于莫拉菌，芽胞杆菌在 1～60d，Simpson（D）基本保持在 0.96、Shannon-Wiener（H）基本保持在 4.77、均匀度（E）基本保持在 0.97、Brillouin 基本保持在 4.77、McIntosh（D_{Mc}）基本保持在 0.80；莫拉菌在 1～30d，Simpson（D）基本稳定，到 60d Simpson（D）从 0.95 下降到 0.89、Shannon-Wiener（H）从 4.56 下降到 3.27、均匀度（E）从 0.93 上升到 0.95、Brillouin（H'）从 4.56 下降到 3.27、McIntosh（D_{Mc}）从 0.76 下降到 0.67。从最后一次取样看（60d），芽胞杆菌的 Simpson（D）比莫拉菌提高 7.9%，Shannon-Wiener（H）提高 48.3%，均匀度（E）提高 4.2%，Brillouin 指数提高 48.3%，McIntosh（D_{Mc}）提高 20.9%。

表 4-28　芽胞杆菌与莫拉菌种群多样性指数

种群名称	天数	样方数	种群总数	Simpson（D）	Shannon（H）	均匀度（E）	Brillouin (H')	McIntosh（D_{Mc}）
芽胞杆菌 *Bacillus* spp.	1	30	1 846 169.00	0.96	4.76	0.97	4.76	0.80
	30	30	4 069 372.00	0.96	4.77	0.97	4.77	0.80
	60	30	1 862 995.00	0.96	4.85	0.99	4.85	0.81
莫拉菌 *Moraxella* spp.	1	30	415 384.00	0.95	4.56	0.93	4.56	0.77
	30	27	580 374.00	0.94	4.41	0.93	4.41	0.76
	60	11	49 855.00	0.89	3.27	0.95	3.27	0.67

四、芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位宽度指数和生态位重叠指数

生态位宽度指数测定结果见表 4-29，芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位宽度指数差异较大，芽胞杆菌的种群生态位宽度指数平均值为 26.3，比莫拉菌的 15.2 高 73%，表明芽胞杆菌具有更宽的生态位宽度指数，能更好地利用资源。从采样时间的变化看，芽胞杆菌生态位宽度指数基本保持为 26.0～27.8，变化不大；莫拉菌生态位宽度指数随着时间变化很大，在 1d 取样时，生态位宽度指数为 18.8515，30d 时微微下降到 17.9194，60d 时急速下降到 8.8535，表明随着时间进程，莫拉菌对资源利用的能力越来越低。

表 4-29　芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位宽度指数

种群名称	采样时间/d	Levins（B）	标准值
芽胞杆菌 *Bacillus* spp.	1	25.0974	0.8309
	30	26.0782	0.8648
	60	27.8260	0.9250
平均值		26.3339	0.8736
莫拉菌 *Moraxella* spp.	1	18.8515	0.6156
	30	17.9194	0.6507
	60	8.8535	0.7854
平均值		15 2081	0.6839

生态位重叠指数检测结果见表 4-30。结果表明，随着时间进程，芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数逐渐下降，1d 时芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数为 0.9174，表明两个菌有 91.74%的生态位重叠；30d 时芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数为 0.8703，表明两个菌有 87.03%的生态位重叠；60d 时芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数为 0.5662，表明两个菌有 56.62%的生态位重叠。

表 4-30　芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数

项目	第 1 天芽胞杆菌与莫拉菌	第 30 天芽胞杆菌与莫拉菌	第 60 天芽胞杆菌与莫拉菌
Pianka 测度	0.9174	0.8703	0.5662

五、芽胞杆菌与莫拉菌种群空间格局相互关系

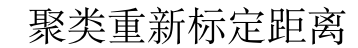
芽胞杆菌与莫拉菌种群空间格局参数见表 4-31，以表 4-31 为矩阵，以天数为样本，以空间格局参数为指标，进行相关系数计算，结果见表 4-32，聚类分析结果见图 4-37。当 λ=8 时，可将结果分为 3 类，第 1 类为种群多样性指数特性，包括参数有 Simpson（D）、Shannon-Wiener（H）、Brillouin（H'）、McIntosh（D_{Mc}）、生态位宽度 Levins（B）、负二项分布 K、均匀度（E）。可以看出生态位宽度 Levins（B）与上述前 4 项指数的相关系数分别为 0.94、0.67、0.94、0.97，都表现出极显著相关，表明这些多样性指数越高，生态位宽度越大。负二项分布 K 和均匀度（E）与生态位宽度的相关系数分别为 0.82、0.67，显著相关，负二项分布 K 和均匀度（E）值越大，生态位宽度越大。第 2 类为空间分布型特性，包括参数有总和、平均拥挤度（M*）、丛生指标（I）、扩散系数（C），种群数量与其他空间分布型指标呈显著相关，相关系数为 0.74～1.0，表明种群数量直接影响着种群的空间分布，种群数量越大，平均拥挤度（M*）、丛生指标（I）、扩散系数（C）的值越大。第 3 类为聚块性指标特性，包括参数有 Ca 指标和聚块性指标（M*/M），他它们与多样性指数和生态位宽度呈负相关，即这些指标越大，种群多样性指数和生态位宽度值越小。

表 4-31　芽胞杆菌与莫拉菌种群空间格局参数

参数	芽胞杆菌脂肪酸生物标记 15:0 ANTEISO			莫拉菌脂肪酸生物标记 16:0 N ALCOHOL		
	1d	30d	60d	1d	30d	60d
总和	18 46169	4 069 372	1 862 995	415 384	580 374	49 855
平均拥挤度（M*）	73 973.54	156 747.54	67 117.79	22 315.86	32 836.85	5 766.97
丛生指标（I）	12 434.57	21 101.8	5 017.96	8 469.73	13 491.05	4 105.14
聚块性指标（M*/M）	1.2	1.16	1.08	1.61	1.7	3.47
Ca 指标	0.2	0.16	0.08	0.61	0.7	2.47
扩散系数（C）	12 435.57	21 102.8	5 018.96	8 470.73	13 492.05	4 106.14
负二项分布 K	4.95	6.43	12.38	1.64	1.43	0.41
Simpson（D）	0.96	0.96	0.96	0.95	0.94	0.89
Shannon（H）	4.76	4.77	4.85	4.56	4.41	3.27
均匀度（E）	0.97	0.97	0.99	0.93	0.93	0.95
Brillouin	4.76	4.77	4.85	4.56	4.41	3.27
McIntosh（D_{Mc}）	0.8	0.8	0.81	0.77	0.76	0.67
Levins（B）	25.0974	26.0782	27.826	18.8515	17.9194	8.8535

表 4-32　芽胞杆菌与莫拉菌种群空间格局参数间相关系数

参数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 总和	1.00											
2. 平均拥挤度（M^*）	1.00	1.00										
3. 丛生指标（I）	0.74	0.79	1.00									
4. 聚块性指标（M^*/M）	−0.64	−0.64	−0.51	1.00								
5. Ca 指标	−0.64	−0.64	−0.51	1.00	1.00							
6. 扩散系数（C）	0.74	0.79	1.00	−0.51	−0.51	1.00						
7. 负二项分布 K	0.60	0.55	0.01	−0.65	−0.65	0.01	1.00					
8. Simpson（D）	0.63	0.63	0.50	−1.00	−1.00	0.50	0.62	1.00				
9. Shannon（H）	0.61	0.62	0.48	−1.00	−1.00	0.48	0.64	1.00	1.00			
10. 均匀度（E）	0.64	0.58	0.00	−0.40	−0.40	0.00	0.88	0.38	0.39	1.00		
11. Brillouin（H'）	0.61	0.62	0.48	−1.00	−1.00	0.48	0.64	1.00	1.00	0.39	1.00	
12. McIntosh（D_{Mc}）	0.67	0.66	0.47	−0.99	−0.99	0.47	0.71	0.99	0.99	0.49	0.99	1.00
13. Levins（B）	0.76	0.74	0.44	−0.95	−0.95	0.44	0.82	0.94	0.94	0.67	0.94	0.97



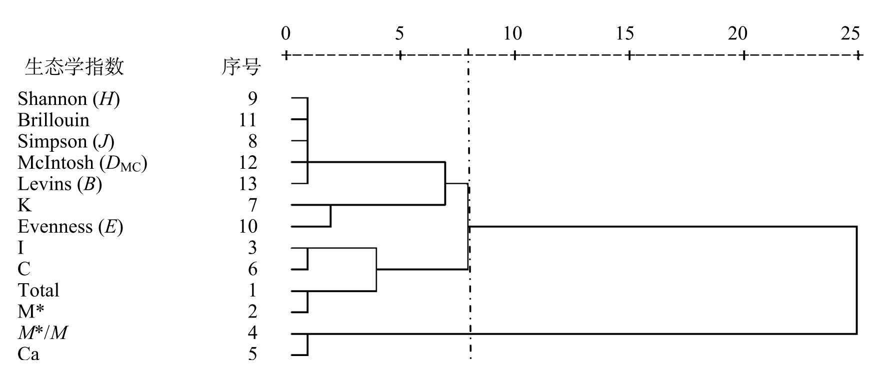


图 4-37　芽胞杆菌与莫拉菌种群空间格局聚类分析

六、讨论

芽胞杆菌与莫拉菌种群多样性指数分析表明，芽胞杆菌种群多样性指数总体上高于莫拉菌，同时，3 次取样芽胞杆菌种群多样性指数变化不大，保持稳定；莫拉菌种群多样性指数变化较大，表明芽胞杆菌种群的稳定性高于莫拉菌。从最后一次取样看（60d），芽胞杆菌的 Simpson（D）比莫拉菌高 7.8%，Shannon-Wiener（H）提高 48.3%，均匀度（E）提高 4.2%，Brillouin（H'）指数提高 48.3%，McIntosh（D_{Mc}）提高 20.8%。微生物 Shannon-Wiener 多样性指数是根据信息论建立起来的最通用的度量，该指数表征在信息通讯中的某一瞬间，一定符号出现的不定度及它传递的信息总和。在群落的多样性测度上，借用了信息论中这种不确定性的度量方法。Pielou（1975）认为多样性应该是“等

于从一个群落中随机抽取一个个体的种的不定量”。显然，群落的多样性指数越高，其不定性就越不稳定，也即确定性就越稳定。两个相关的益生菌和病原菌同处一个空间，多样性指数高者，有利于种群的稳定发展，低者则容易被削弱，芽胞杆菌与莫拉菌种群多样性指数随采样时间的变化证明了这一规律。

芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位宽度指数和生态位重叠指数分析表明，芽胞杆菌的种群生态位宽度指数平均值比莫拉菌高 73%，表明芽胞杆菌种群具有比莫拉菌更宽的生态位宽度，能更好地利用资源。从采样时间的变化看，芽胞杆菌生态位宽度指数基本保持为 26.0～27.8，变化不大；莫拉菌生态位宽度指数随着时间变化很大，在 1d 取样时，生态位宽度指数为 18.8515，30d 时微微下降到 17.9194，60d 时急速下降到 8.8535，表明随着时间进程，莫拉菌对资源利用的能力越来越低。微生物种群的生态位宽度是微生物种群竞争能力的一个指标，生态位宽度越宽，竞争能力越强。

芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数逐渐下降，1d 时芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数为 0.9174，表明两个菌有 91.74%的生态位重叠；30d 时芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数为 0.8703，表明两个菌有 87.03%的生态位重叠；60d 时芽胞杆菌与莫拉菌种群生态位重叠指数为 0.5662，表明两个菌有 56.62%的生态位重叠。生态位重叠是两个关联微生物在生态位相互作用的基础，生态位重叠越高，两个微生物相互关系越密切，一种微生物种群数量的下降，或空间分布型的移位，或多样性指数的下降，都能导致生态位重叠的缩小。

第六节　新疆部分地区芽胞杆菌种类分布多样性

一、概述

微生物的物种资源极其丰富，是地球上仅次于昆虫的第二大类群，微生物多样性的研究是整个生物多样性研究的重要组成部分。而芽胞杆菌又是微生物中一种非常重要的资源，研究芽胞杆菌的系统发育多样性有着十分重要的意义。芽胞杆菌在农业、工业、医药、卫生、环保等方面具有重要作用，它可用于防治植物病虫害，降解土壤中难溶的含磷、含钾化合物，固定空气中的氮，生产纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶，生产药用色素，处理工业废水和降解原油等，故对土壤中芽胞杆菌的种类、含量和生物多样性研究备受国内外学者关注（薛立等，2003；Lavrieat，1998；Salamancaef，2006；Torres，2005）。近些年来，关于芽胞杆菌生态分布的文献一直有报道。

张华勇等（2003）对红壤地点不同生态条件下的芽胞杆菌物种多样性进行了研究，初步结果表明，在多样性指数中，无论是 Shannon-Wiener（*H*）多样性指数还是 Simpson（*D*）优势度指数都有如下规律：林地>旱地>水田>侵蚀地。物种的丰富度指数、均匀度指数也有类似规律；王学聘等（1999）和戴莲韵等（1994）则展开了我国不同区域中森林土壤苏云金芽胞杆菌分布的研究，为这一资源的进一步开发利用奠定了基础。曹均等（2010）对北京 9 个典型板栗园土壤碳代谢微生物多样性特征进行了研究，结果表明：9 个土壤可分为 3 组，组内土壤微生物碳代谢功能群结构相似，而每组之间有显著性的差

异。郑华等（2004）对红壤侵蚀区恢复森林群落物种多样性进行研究，结果表明：研究样地中物种多样性以天然次生林最高。耿海波等（2009）对新疆十红滩砂岩型铀矿床中微生物多样性进行研究，结果表明：氧化带微生物种类和数量较多，好氧的铁细菌为其中的优势菌群。对不同地点和不同生境类型中的微生物多样性都有研究，但对新疆不同地点土壤微生物多样性研究未见报道，所以本实验拟对新疆不同地点微生物进行研究，新疆位于我国西北部，地处欧亚大陆中心。年均气温 11.4～11.7℃，昼夜温差大，干旱少雨，光照充足。本实验采用格网抽样和重点抽样相结合的混合随机抽样技术，根据不同地点的不同生境类型进行了样点的设计与采集。对采自新疆 4 个地点即阿克苏、喀什、阿拉尔和塔克拉玛干沙漠的 14 份土壤标本进行了平板分离纯化及鉴定（王秋红等，2007），同时也探讨了该地点芽胞杆菌的物种多样性，旨在探明该地点芽胞杆菌的种群分布特征。芽胞杆菌地理分布的多样性研究方法如下。

二、研究方法

1. 土样样品采集

土样采集于新疆 4 个不同地点，分别是阿克苏、喀什、阿拉尔和塔克拉玛干沙漠。采用 5 点采样法分别取 5～20cm 深度的土壤混合，装入采集袋，采集完成马上带回实验室进行分离。土壤样品采集来源情况详见表 4-33。

表 4-33　土壤样品信息

采集地点	编号	样品来源	经度	纬度	海拔/m	采集时间
新疆阿克苏	FJAT-4135	新疆温宿峡谷盐碱地	80°45′24.67′	41°33′36.76′	1507	2010/08/04
	FJAT-4150	新疆乌帕二桥	80°45′24.67′	41°33′36.76′	1506	2010/08/09
	FJAT-4149	新疆峡谷干旱老树下	80°45′24.67′	41°33′36.76′	1503	2010/08/05
	FJAT-4137	新疆岩石上土	80°45′24.57′	41°33′36.74′	1568	2010/08/05
新疆喀什	FJAT-4146	新疆喀什（I）	75°59′32.85′	39°28′2.40′	1296	2010/08/09
	FJAT-4147	新疆喀什（II）杂草	75°59′2.87′	39°27′32.50′	1290	2010/08/08
	FJAT-4148	新疆喀什（II）杏树下土样	76° 5′19.31′	39°27′10.69′	1271	2010/08/09
新疆阿拉尔	FJAT-4143	新疆塔里木大学果树下	81°17′50.04′	40°32′40.91′	1015	2010/08/06
	FJAT-4144	新疆塔里木场花下土样	81°16′28.38′	40°32′23.96′	1012	2010/08/09
	FJAT-4145	新疆塔里木大学草坪土样	81°17′50.04′	40°32′40.91′	1012	2010/08/09
新疆图木舒克（塔克拉玛干沙漠）	FJAT-4140	新疆沙漠红柳根	87° 8′2.79′	40°45′40.29′	867	2010/08/06
	FJAT-4142	新疆沙漠胡杨根土	83° 31′46.79"	40°39′54.43"	934	2010/08/06
	FJAT-4136	新疆沙棘根郎（根）	87° 8′2.79"	40°45′40.29"	867	2010/08/11
	FJAT-4139	新疆沙漠骆驼棘根部	87° 8′2.79"	40°45′40.29"	867	2010/08/06

2. 芽胞杆菌的分离及保存

分别称取土壤标本 5g 至装有 45ml 无菌水的三角瓶中，振荡 30min，然后 80℃水浴 15min，并且每隔 5min 振荡一次。土壤原液分别稀释至 10^{-2}、10^{-3} 等浓度，各取 100μl 稀释液涂于 NA 平板上进行芽胞杆菌的分离，每个梯度 3 次重复。根据菌落形状、颜色、边缘状态、透明度、表面干湿状态等特征和脂肪酸检测结果判断分离得到的菌株的种类并进行菌落计数。按常规方法挑取单菌落纯化后保存，供测试鉴定。

3. 芽胞杆菌的鉴定

芽胞杆菌脂肪酸提取及鉴定参见第四章第四节。16S rDNA 鉴定：主要试剂和仪器，PCR 仪为 Bio-rad 公司产品；菌株 DNA 提取、16S rDNA 片段扩增所用的各种酶、标记物（Marker）、dNTP 等试剂为上海博尚生物技术有限公司产品。DNA 的提取及 16S rRNA 序列的测定，采用 Promega 试剂盒进行。采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系（25μl）：2.5μl 10× Buffer、0.5μl 10mmol/L dNTP、引物各 1μl、0.3μl（5U/μl）的 *Taq* 酶和 1μl DNA 模板。PCR 反应程序：94℃预变性 5min，94℃变性 30s，55℃退火 45s，72℃延伸 1min 30s，35 个循环，最后 72℃延伸 10min。PCR 产物的检测：取 2μl PCR 产物，点样于 1.5%的琼脂糖凝胶中，以 100bp Marker 作为标准分子质量，100V 电压，电泳 40min，EB 染色，用凝胶成像系统观察结果。16S rRNA 序列数据分析，测序结果经 NCBI 上的 Blast 比对，得到最相近的匹配结果，并下载相近模式菌株的序列用 ClustalX 软件进行序列比对，然后利用 Mega 4.0 软件 Neighbor-Joining 法进行聚类分析，同时 Bootstrap 值取 1000 次进行重复验证进化树的可靠性。

4. 土壤中芽胞杆菌群落结构多样性

物种多样性反映了群落中物种的丰富度、变化程度或均匀度，也反映了不同环境条件与群落的相互关系、尤其是群落物种多样性在一般情形下与群落的稳定和动态有很大关系。为了反映一个地点的物种情况，在研究物种多样性中常常采用物种的 Margalef（S）丰富度指数、Shannon-Wiener（H_1）多样性指数（Feng，2002）、Pielous（J）均匀度指数（孙海新和刘训理，2004）、Simpson （D）优势度指数（孙海新和刘训理，2004）等方法。本节所采用的物种丰富度（陈梦，2003），用 Margalef（S）丰富度指数（$S=N$，其中 N 为每个样点所分离的种数）表示；分离频度是指某一物种在样本总体中的出现频率，根据分离频度将优势度划分成 4 个等级，即分离频度>0.50 为优势种，0.30～0.50 为最常见种，0.10～0.30 为常见种，<0.10 为稀有种（张英等，2003）。

三、芽胞杆菌种类分子鉴定

采用稀释涂布平板法从新疆 4 个地点采集的 14 份土样中共分离得到 53 株芽胞杆菌，经美国 Sherlock MIDI 鉴定系统初步鉴定为芽胞杆菌属 13 个种：深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）、枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、嗜碱芽胞杆菌（*B. alcalophilus*）、

蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）、黏性芽胞杆菌（*B. viscosus*）、简单芽胞杆菌（*B. simplex*）、球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）、缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）。为了进一步确定 MIDI 鉴定结果的准确性，从每种芽胞杆菌中选取一株检测结果相似性系数最低的菌株，提取 DNA 进行 16S rDNA 扩增，测定 16S rDNA 约为 1.5kb 的序列。将扩增产物送到上海博尚生物技术有限公司进行测序比对，比对结果见表 4-34。16S rDNA 在 GenBank 中的序列号如表 4-34。

表 4-34　芽胞杆菌脂肪酸鉴定与 16S rDNA 鉴定结果比较

菌株编号	MIDI 鉴定	相似系数	16S rDNA 鉴定	NCBI 编号	相似度/%
FJAT-10589	*B. atrophaeus*	0.732	*B. atrophaeus*	JN540796	99
FJAT-10593	*B. subtilis*	0.435	*B. subtilis*	JN540798	99
FJAT-10698	*B. licheniformis*	0.838	*B. licheniformis*	JN540805	100
FJAT-10599	*B. megatherium*	0.557	*B. megatherium*	JN540807	99
FJAT-10594	*B. cereus*	0.743	*B. cereus*	JN540799	99
FJAT-10694	*B. alcalophilus*	0.537	*B. alcalophilus*	JN540804	99
FJAT-10700	*B. mycoides*	0.597	*B. mycoides*	JN540806	99
FJAT-10686	*B. firmus*	0.685	*B. firmus*	JN540802	99
FJAT-10684	*B. viscosus*	0.623	*B. endophyticus*	JN540801	100
FJAT-10590	*B. simplex*	0.590	*B. simplex*	JN540797	99
FJAT-10597	*L. sphaericus*	0.590	*L. sphaericus*	JN540808	99
FJAT-10603	*B. lentus*	0.610	*B. lentus*	JN540800	99
FJAT-10687	*B. pumilus*	0.685	*B. pumilus*	JN540803	99

下载这 13 种芽胞杆菌的模式菌株 16S rDNA 序列，与测序的序列通过 ClustalX 软件和 Mega 4.0 程序进行序列的比对，然后由 Neighbor-Joining 法生成发育树状图。由图 4-38 可见，代表菌株 JN540798 与枯草芽胞杆菌（*B.subtilis* ATCC6051，DSM10）构成一个分支，亲缘关系最近，序列相似性最高。代表菌株 JN540802、JN540801、JN540807 和 JN540797 分别和菌株坚强芽胞杆菌、内生芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌和简单芽胞杆菌构成一支，其共同特点是：测试菌株与两株模式菌株的亲缘关系较远。菌株 JN540796 与两株模式菌株 DMS2764 和 NCMB12899 构成一支，但菌株 JN540796 与模式菌株 DMS2764 的亲缘关系要大于 NCMB12899，代表菌株 JN540804 和 JN540803 与模式菌株短小芽胞杆菌具有较近的亲缘关系，构成一个分支，但两菌株 16S rDNA 序列比对结果不同，测序结果分别为深褐芽胞杆菌和短小芽胞杆菌，菌株 JN540799、JN540800//JN540805 与对应模式菌株存在较大差异，可能是由于芽胞杆菌属中各个种之间具有较近的亲缘关系，在种的系统发育上也存在一定的交叉，各菌株间序列差异较小。

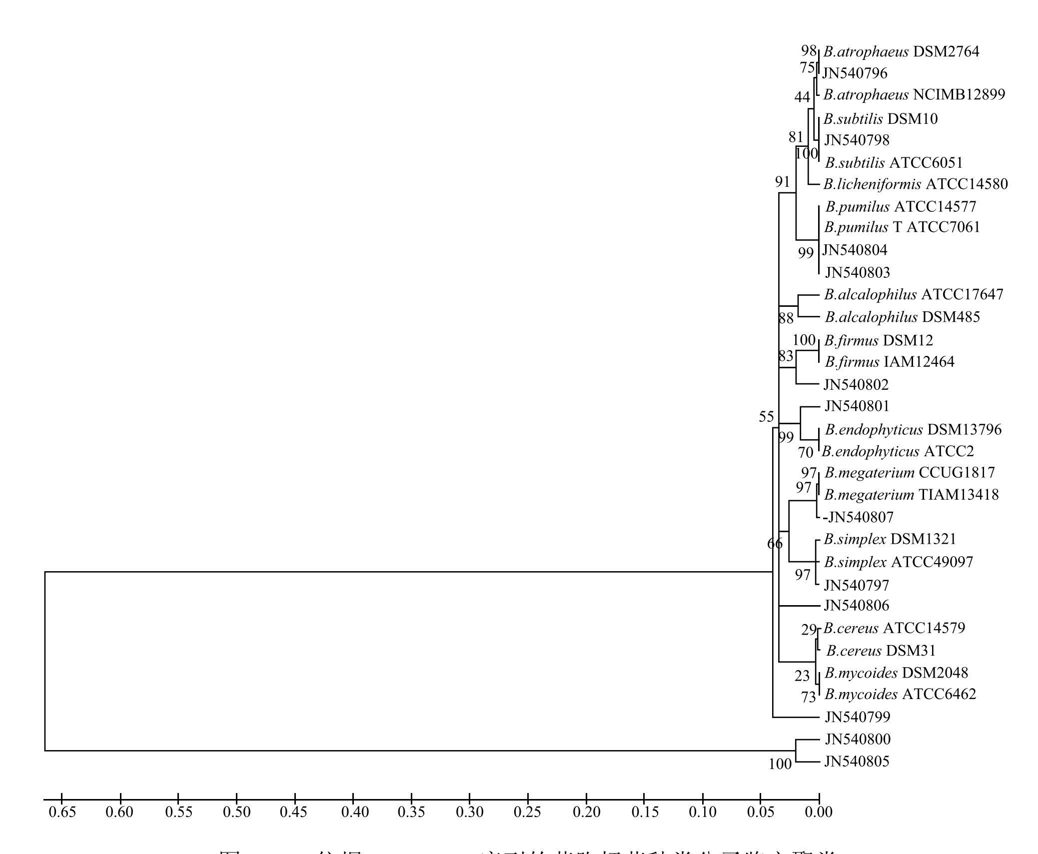


图 4-38　依据 16S rDNA 序列的芽胞杆菌种类分子鉴定聚类

四、芽胞杆菌种类脂肪酸与分子鉴定比较

采用 MIDI 和 16S rDNA 测序两种方法对菌株进行鉴定，鉴定结果见表 4-34，从表中可见 MIDI 鉴定结果和 16S rDNA 测序鉴定结果基本一致，只有菌株 FJAT-10684 的 MIDI 鉴定结果为黏性芽胞杆菌（*B. viscosus*），16S rDNA 测序鉴定结果为内生芽胞杆菌（*B. endophyticus*），而黏性芽胞杆菌是非正式发表有效种名，对其真正分类地位还待考证。以上表明 MIDI 鉴定系统对芽胞杆菌鉴定的可靠性非常高，几乎达 100%。

五、芽胞杆菌含量分布

对新疆地区 4 个地点采集的 14 份土壤标本进行分离计数，不同地点芽胞杆菌的总数、芽胞杆菌丰富度和优势种群见表 4-35 和表 4-36，不同地点分离的芽胞杆菌种类和数量均有较大差别，总体来说，新疆喀什和阿拉尔市两个地点分离得到的芽胞杆菌数量最多，分别为 108.96×10^4CFU/g 和 112.01×10^4CFU/g; 塔克拉玛干沙漠中分离到的芽胞杆菌数量最少，只有 4.13×10^4CFU/g，阿克苏的芽胞杆菌数量为 65.76×10^4CFU/g。

表 4-35　同种芽胞杆菌在不同地点的含量

名称	阿克苏		喀什		阿拉尔		塔克拉玛干沙漠	
	菌落数/(×10^4CFU/g)	含量百分比/%	菌落数/(×10^4CFU/g)	含量百分比/%	菌落数/(×/g)	含量百分比/%	菌落数/(×10^4CFU/g)	含量百分比/%
B.atrophaeus	0.11	18%	0.26	0.24%	–	–	0.13	3.15
B. subtilis	–	–	23.80	21.84%	10	8.93	0.65	15.74
B.licheniformis	–	–	18.80	17.25%	6.00	5.37	0.11	2.66
B. megatherium	11.10	16.88%	11.60	10.65%	–	–	0.61	14.78
B. cereus	52.30	79.53%	26.50	24.32%	8.00	7.14	0.07	1.69
B. alcalophilus	–	–	–	–	7.00	6.25	0.34	8.28
B. mycoides	–	–	–	–	0.01	0. 01	–	–
B. firmus	0.02	0. 03%	20.00	18.36%	48.70	43.48	0.20	4.84
B. endophyticus	0.03	0. 05%	6.00	5.51%	9.30	8.30	-	-
B. simplex	0.53	0. 81%	–	–	–	–	0.01	0.24
L. sphaericus	–	–	–	–	–	–	0.01	0.24
B. lentus	1.67	2.54%	–	–	–	–	–	–
B.pumilus	–	–	2.00	1.84%	23.00	20.53	2.00	48.43

表 4-36　新疆 4 个地点芽胞杆菌的种类数量

采集地区	菌落数量/(×10^4CFU/g)	种类数量	优势芽胞杆菌群
阿克苏	65.76	7	*B. atrophaeus*, *B. megatherium*，*B. cereus*
喀什	108.96	8	*B. licheniformis*，*B. megatherium*，*B. cereus*，*B. firmus*，*B. pumilus*
阿拉尔市	112.01	8	*B. cereus*，*B. firmus*，*B. pumilus*
塔克拉玛干沙漠	4.13	10	*B. cereus*，*B. firmus*，*B. pumilus*

由表 4-35 可知，同一种芽胞杆菌在不同地点的含量相差很大。例如，蜡状芽胞杆菌（*B.cereus*）在阿克苏的含量为 5.230×10^5CFU/g，而在塔克拉玛干沙漠的含量仅仅为 0.70×10^3CFU/g。从表 4-35 还可看出，缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）是阿克苏地特有的芽胞杆菌，阿拉尔和塔克拉玛干沙漠的特有芽胞杆菌分别是蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）和球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）。这些特有芽胞杆菌在各个地点的共同特点是它们的含量非常低，最高也只有 1.67×10^4 CFU/g。

从表 4-36 可见，4 个地点分离得到的芽胞杆菌种类相差不大，都可分离得到 7～10 种，但比较特殊的是塔克拉玛干沙漠中分离到的芽胞杆菌种类最多。根据高雄飞等（1996）提到某个物种占整体的百分比≥10%为优势种，1%～10%为常见种，≤1%为少见种这一特点，从表 4-35 可以统计每个地点都具有最少 3 种优势菌，新疆喀什地点的优势种最多为 5 种，而每个地点可能含有相同的优势种群，如巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）和蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）是阿克苏和喀什共有的优势种，蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）和短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）是喀什、阿拉尔和塔克拉玛干沙

漠共有的优势种。阿克苏的常见种和少见种分别为：缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）和坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）、简单芽胞杆菌（*B. simplex*）、内生芽胞杆菌（*B. endophyticus*），喀什的常见种和少见种分别为内生芽胞杆菌（*B. endophyticus*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）和深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*），阿拉尔的常见种和少见种分别为枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、地衣芽胞杆菌（*B.licheniformis*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、嗜碱芽胞杆菌（*B. alcalophilus*）、内生芽胞杆菌（*B. endophyticus*）和蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*），塔克拉玛干沙漠的常见种和少见种分别为：深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）、嗜碱芽胞杆菌（*B. alcalophilus*）、地衣芽胞杆菌（*B.licheniformis*）、蜡状芽胞杆菌（*B.cereus*）、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）和简单芽胞杆菌（*B. simplex*）、球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）。

六、芽胞杆菌种类多样性

从表 4-37 可以看出，新疆 4 个地点采集的 14 份土壤标本中都含有芽胞杆菌，物种多样性较丰富，4 个地点共分离到 53 株、13 种芽胞杆菌，每个地点分离的种类数量为 7～10 种。阿克苏可分离得到 7 种芽胞杆菌，其物种多样性指数（*H*）和均匀度指数（*J*）分别为 0.9107 和 0.3244，新疆喀什和阿拉尔可分离得到 8 种芽胞杆菌，其物种多样性指数（*H*）和均匀度指数（*J*）分别为 2.5628、2.3500 和 0.8543、0.7833，而塔克拉玛干沙漠的种类数量最高为 10 种，优势度指数（*D*）最高为 0.9339。

表 4-37　新疆 4 个地点的芽胞杆菌物种多样性

采集地区	种类数量	菌落数量/个	Simpson（*D*）	Shannon（*H*）	Pielou(*J*)
阿克苏	7	66	0.3435	0.9107	0.3244
喀什	8	109	0.8225	2.5628	0.8543
阿拉尔	8	112	0.7487	2.3500	0.7833
塔克拉玛干沙漠	10	4	0.9339	2.2803	0.6864

七、芽胞杆菌脂肪酸生物标记分布差异

对不同地点同种芽胞杆菌进行磷脂脂肪酸检测，分析检测结果发现，同种芽胞杆菌在不同地点的脂肪酸种类和含量差异很大。蜡状芽胞杆菌在阿克苏分离的菌株可检测到 18 种磷脂脂肪酸生物标记，喀什可分离的两株蜡状芽胞杆菌含有磷脂生物标记分别为 24 种和 25 种，而在阿拉尔和塔克拉玛干沙漠有 21 种磷脂脂肪酸生物标记，总体表现为喀什>阿拉尔=塔克拉玛干沙漠>阿克苏。从地点的分布来看，新疆喀什距离其他 3 个地点较远，可能和采样地点的远近有关。从表 4-38 可知，每种菌的不同脂肪酸生物标记的含量在各个地点都有差异，但同一地点分离的两株菌磷脂脂肪酸种类和含量变化较小，在喀什分离得到的两株菌的脂肪酸种类基本相同，仅相差一种磷脂脂肪酸生物标记，而与其他 3 个地点相差较大。蜡状芽胞杆菌的主要脂肪酸为：13:0 ISO 3OH、14:0、16: 10-METHYL、15:0 ISO 3OH。这 4 种脂肪酸在新疆 4 个地点的含量相差很大，最大相差 6.44，最小相差 1.76。而由于塔克拉玛干沙漠地点生境类型的特殊性，分离的芽胞杆菌磷脂脂肪酸含

量都小于其他 3 个地点分离的芽胞杆菌。

表 4-38　同种芽胞杆菌在不同地点的脂肪酸标记的种类和含量

PLFAs 种类	阿克苏	喀什（I）	喀什（II）	阿拉尔	塔克拉玛干沙漠	均值	方差	标准差
第一类								
12:0 2OH	1.31	0.77	0.79	0.67	0.48	0.8040	0.0951	0.3084
第二类								
15:0 ISO 3OH	27.1	24.5	23.84	24.99	26.58	25.4020	1.9235	1.3869
13:0 ISO 3OH	16.09	12.66	13.33	12.2	9.65	12.7860	5.3515	2.3133
16:1 ISO I/14:0 3OH	12.65	9.97	9.26	11.51	9.24	10.5260	2.2613	1.5038
17:1 ISO ω5c	1.83	3.58	2.85	2.27	2.82	2.6700	0.4372	0.6612
16:0 10-METHYL	5.19	3.57	2.93	4.11	2.85	3.7300	0.9290	0.9638
18:0 ANTE/18:2 ω6, 9c	2.3	3.71	3.92	4.8	3.7	3.6860	0.8044	0.8969
15:0 ISO	6.11	2.89	2.76	3.53	4.93	4.0440	2.0745	1.4403
16:0 3OH	3.46	4.4	4.06	4.44	5.81	4.4340	0.7458	0.8636
14:0	5.06	5.99	5.2	5.9	4.23	5.2760	0.5114	0.7151
14:0 ISO 3OH	4.45	5.63	5.48	6.41	5.6	5.5140	0.4892	0.6994
16:0N ALCOHOL	3.3	6.41	6.96	5.82	7.79	6.0560	2.9001	1.7030
17:0 ISO 3OH	4.03	8.23	8.77	6.52	8.1	7.1300	3.7057	1.9250
第三类								
10:0 2OH	0	0	1.19	0.36	0	0.3100	0.2663	0.5160
13:0 ISO	2.78	0.74	0.84	1.34	1.34	1.4080	0.6651	0.8155
15:0 ANTEISO	0.68	0.85	0.61	0.77	0.58	0.6980	0.0126	0.1121
17:0	0	0.87	0.9	0.73	1.21	0.7420	0.2028	0.4503
18:0 2OH	0	0.6	0.37	0	0.61	0.3160	0.0924	0.3040
17:1 ω6c	1.11	0.76	0.72	0.73	1.08	0.8800	0.0389	0.1971
17:0 ISO	1.04	1.38	1.31	0.83	1.88	1.2880	0.1577	0.3971
15:1 ω6c	0	0	0	0.35	0	0.0700	0.0245	0.1565
18:3 ω6c(6, 9, 12)	0	0.15	0.24	0	0	0.0780	0.0124	0.1114
16:1 ISO H	0	0	0.29	0	0	0.0580	0.0168	0.1297
16:1 ω5c	0	0.17	0.12	0	0.32	0.1220	0.0178	0.1335
18:1 ω5c	0	0.25	0.24	0	0	0.0980	0.0180	0.1342
19:1 ISO I	0	0.18	0.24	0	0	0.0840	0.0137	0.1170
11:0 2OH	1.51	1.27	1.74	1.72	1.19	1.4860	0.0635	0.2521

续表

PLFAs 种类	阿克苏	喀什（I）	喀什（II）	阿拉尔	塔克拉玛干沙漠	均值	方差	标准差
均值	3.7037	3.6863	3.6852	3.7037	3.7033			
方差	36.7256	28.6033	27.5874	29.7228	30.3266			
标准差	6.0602	5.3482	5.2524	5.4519	5.5070			

用表 4-38 中脂肪酸种类和 4 个采样点分离的芽胞杆菌磷脂脂肪酸含量的平均值进行聚类分析，当马氏距离为 11.38 时，可将 27 种磷脂脂肪酸分为三大类如图 4-39，第一类只有一种磷脂脂肪酸标记：15:0 ISO 3OH，第二类为 13:0 ISO 3OH、17:1 ISO ω5c、15:0 ISO、14:0 ISO 3OH 等 11 种磷脂脂肪酸，第三类共含有磷脂脂肪酸 15 种，分别为 12:0 2OH、19:1 ISO I、11:0 2OH、10:0 2OH、18:0 2OH、16:1 ω5c 等。这三类磷脂脂肪酸的特点分别是：第一类的一种脂肪酸为完全分布，在每个地点分离到的蜡状芽胞杆菌都含有这种磷脂脂肪酸，且磷脂脂肪酸的含量最高为 25.4020；第二类的 11 种磷脂脂肪酸也为完全分布，但它们的脂肪酸含量相对较低，为 12.786～2.6700，方差和标准差相差较大，说明它们在不同地点的磷脂脂肪酸含量变化较大；第三类的 15 种磷脂脂肪酸为完全分布和不完全分布，不完全分布就是这种脂肪酸不是在每个地点分离获得的芽胞杆菌中都含有，并且它们的含量都非常低，都为 1.4860 以下，但它们的方差和标准差变化较小，为 0.2633～0.0124，说明它们的含量相对稳定。

用 DPS 聚类分析软件中的数据不转换、可变类平均法、马氏距离作为聚类分析法对 4 个不同地点脂肪酸总含量的平均值进行分析。分析结果见图 4-40，当马氏距离在 3.04 时，可将蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）的采集地分为两类，喀什（I）和喀什（II）为一类，阿克苏、阿拉尔和塔克拉玛干沙漠为第二类，这两类的特点是：第二类 3 个采样地点较近，而第一类喀什（I、II）距离其他 3 个地点的距离较远，此实验说明距离的远近对脂

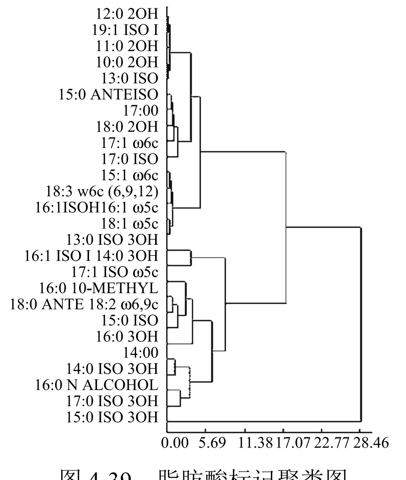


图 4-39　脂肪酸标记聚类图

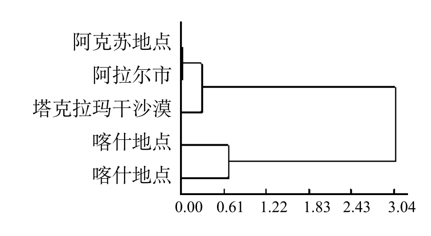


图 4-40　采集地点聚类图

肪酸种类和含量影响非常大。而阿拉尔、阿克苏和塔克拉玛干沙漠的距离也相对较远，可能是由于塔克拉玛干沙漠的特殊环境造成的。

八、讨论

土壤微生物种群数量和生物量主要受其生存的环境条件如气候、植被、土壤理化性质、经纬度和海拔等影响（程东升，1993）。微生物生长繁殖除了需要一定热量和通气条件外，碳氮化合物是土壤微生物细胞必需的组成物质和主要能源，与土壤微生物生存和繁殖密切相关（Piaohc，2000），而土壤有机碳和各种活性有机质组分都是土壤微生物的碳源和氮源（王清奎等，2003），而不同生境类型的土样中的有机碳和各种活性有机质组分不同，这就决定了不同生境类型土样中的微生物群落数和种类的不同，因此有必要对不同地点土壤标本中的微生物结构多样性进行研究，如张灵玲等（2008）对武夷山土壤中的 Bt 多样性进行了研究，发现两株 Bt 新菌株对白纹伊蚊有很高的杀虫活性，因此可用作杀虫剂；李建洪等（2000）对韩国 620 份土壤中的芽胞杆菌进行研究发现，67 株苏云金芽胞杆菌对不同的昆虫具有不同的活性或毒力；马凡茹等（2009）对高寒草地中的 5 种优势菌进行了鉴定和研究，结果表明 3 株优势菌具有较强的运动性，且这 5 种细菌对不同碳源、氮源及大分子物质的利用能力存在一定差异；唐志燕等（2005）对成都市郊区土壤芽胞杆菌进行了研究，结果表明，芽胞杆菌是成都市郊区土壤细菌中的主要类群，约占细菌总量的 25.3%；石春芝等（2001）对神农架国家级自然保护区九大湖中的芽胞杆菌进行了研究，认为蜡状芽胞杆菌、短小芽胞杆菌、环状芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌是主要种类，也分离到巨大芽胞杆菌，但不是主要种类；朱越雄等（2001）对桑园土壤芽胞杆菌进行分析，结果表明，在上层土和下层土中的芽胞杆菌分布及种类存在较大的差异，在 1～5cm、5～10cm 土层中，芽胞杆菌占细菌总数的百分比分别为 13.37%和 2.32%。

对土壤微生物和植物内生菌进行了大量研究，如朱育菁等（2008）对‘福眼’龙眼果实的内生菌进行分离纯化和脂肪酸鉴定，结果表明，在龙眼果实中检测到分属于肠杆菌属、果胶杆菌属、克吕沃尔菌属和沙门氏菌属等 7 个属的内生菌。车建美等（2010）对几种禾本科牧草内生细菌的分布特性进行了研究，结果表明，内生菌与宿主植株和不同分离部位都存在正相关性，与宿主植株的关系更密切。刘国红等（2008）对芽胞杆菌的系统进化及其属分类学特征进行了深入研究，为本实验的研究提供良好的基础。通过对新疆不同地点的芽胞杆菌进行研究发现，芽胞杆菌在新疆 4 个地点的土壤标本中广泛存在，但各类芽胞杆菌的相对种类和数量随着地点的不同而呈现出较大差异，主要表现为阿拉尔>喀什>阿克苏>塔克拉玛干沙漠。新疆4个地点芽胞杆菌的物种丰富度均为7～10。每个地点至少有 3 种以上的优势种群，最高可达 5 种，所有地点含有的优势菌群基本都是一些常见芽胞杆菌，如巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、蜡状芽胞杆菌（*B.cereus*）、坚强芽胞杆菌（*B. firmus*）和短小芽胞杆菌（*B. pumilus*），而在每个地点都有特有的菌群，如阿克苏的特有菌株为缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）。同一种菌在不同地点的含量差异显著，如蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）在阿克苏的含量为 5.23×10^5CFU/g，而在塔克拉玛干沙漠该菌只有 0.07×10^4CFU/g。

采用 MIDI 鉴定系统和 16S rDNA 序列比对两种方法准确鉴定分离到的菌株，可将

44 株菌分成 13 种不同的芽胞杆菌，通过比较两种鉴定方法发现 MIDI 鉴定系统可准确鉴定芽胞杆菌到种的水平，MIDI 鉴定系统具有高效、快速、成本低等优点。检测一个微生物样本只需提取菌株的脂肪酸即可，且检测速度快，一个样品只需要 9min 即可完成，如果采用 16S rDNA 测序进行鉴定，需要的成本较高，得到结果较慢，一般需要一周左右时间。因此，MIDI 鉴定系统是一种较好的鉴定方法，可在菌株鉴定中广泛使用。通过分析同种芽胞杆菌在不同地点的磷脂脂肪酸标记发现，采集地点的生境类型和采样地点的远近对磷脂脂肪酸的种类和含量影响较大，采样地点越远，磷脂脂肪酸生物标记的种类和含量的变化越大。

应用物种丰富度、物种多样性指数、均匀度指数和优势度指数等指标初步分析了新疆 4 个地点土壤芽胞杆菌的物种多样性。总体来看，该区域芽胞杆菌物种较丰富，绝大多数样点能分离到 7 种以上，少数采样点可达 10 种，3 种指数主要和物种丰富度有关，其次和物种的个体数有关，优势度指数与物种丰富度呈正相关，物种丰富度越高优势度指数也随之增加，如阿克苏的物种丰富度为 7，喀什为 8，塔克拉玛干沙漠为 10，对应的优势度指数分别增大为 0.3435、0.8225、0.9339。当物种丰富度相同的情况时，物种的个体数决定优势度指数、多样性指数、均匀度的变化，个体数与 3 种指数呈负相关。如喀什和阿拉尔的物种丰富度为 8，喀什的个体数小于阿拉尔，而喀什的优势度指数、多样性指数、均匀度指数都要高于阿拉尔，分别为 0.8225>0.7487、2.5628>2.3500、0.8543>0.7833。根据均匀度指数和优势度指数分析，单个样点物种间数量差异大，存在明显的优势种。若要了解该区域芽胞杆菌的分布规律及与其他土壤因子间的关系，还需更全面地设计采样方案和分析更多的样点。

第七节 台湾地区芽胞杆菌种类分布多样性

一、概述

芽胞杆菌是土壤微生物的重要组成部分，在土壤生态系统中占有重要地位。许多芽胞杆菌可以在高酸、高碱、高温、高寒等极端环境下良好生长，具有较大的生态学价值，近几年，陆续有关于不同生态条件下土壤芽胞杆菌的数量和种类分布的报道。王子璇等（2012）对新疆不同地区的芽胞杆菌种类及其多样性进行了调查，结果显示新疆地区芽胞杆菌种类较丰富，不同地点的芽胞杆菌在种类和数量上有很大差异。张华勇等（2003）对红壤地区不同生态系统下芽胞杆菌属内的物种多样性进行了分析，表明芽胞杆菌的多样性指数、种类丰富度指数和均匀度指数随生境的不同即林地、旱地、水田、侵蚀地呈递减趋势。陈仁华（2004）对武夷山不同森林类型土壤微生物分布状况进行了研究，表明不同森林类型土壤异养微生物的数量和组成有明显差异，同一森林类型条件下土壤剖面的不同层次，优势菌和特殊菌也有差异。苏旭东等（2007）对河北省植被覆盖率高、生态系统典型且较完整地区的土壤样品中 Bt 菌株的多样性进行了研究，发现分离到的菌株产生的伴胞晶体形态各异，有长菱形、短菱形、球形、无定形，充分体现了河北省 Bt 资源的多样性。

台湾位于中国大陆东南沿海的大陆架上，地处东经 119°18′03″～124°34′30″，北纬 20°45′25″～25°56′30″，跨温带与热带，属于热带和亚热带气候。台湾四面环海，受海洋性季风调节，年平均温度，除高山外约为 22℃左右；地形中间高、两侧低，东部多山脉、中部多丘陵、西部多平原。台湾地区生态丰富多样，但目前对台湾地区芽胞杆菌多样性的研究仅局限于苏云金芽胞杆菌（Chak and Young, 1990；Chak *et al.*，1994；Chen *et al.*，2004），对其他芽胞杆菌种类分布研究尚未见报道。鉴于此，本研究对台湾不同市（县）土壤中芽胞杆菌种类的多样性及其分布规律进行调查分析。研究方法如下。

二、研究方法

1. 土样样品采集

土样采集于台湾不同市（县），记录采样点的经纬度、土壤特性、样点生境等，每个采样地点采样面积 2cm×2cm =4m^2，采用 5 点采样法，每个样点相距 1m，分别取 10～20cm 深度的土壤 10g，共 500g 混合后装入采集袋，带回实验室进行芽胞杆菌的分离。土壤样品采集地信息详见表 4-39。

表 4-39　土样信息

土样编号	台湾地区市（县）	采集地点	采集时间
FJAT-4570	台北市	台湾台北阳明山花钟	2011/08/28
FJAT-4569		台湾台北阳明山蒋介石雕像下	2011/08/28
FJAT-4568		台湾台北士林官邸芭乐树下	2011/08/28
FJAT-4566		台湾台北士林官邸白千层树下	2011/08/28
FJAT-4567		台湾台北士林官邸草坪土	2011/08/28
FJAT-4559	桃园县	台湾慈湖石像群	2011/08/27
FJAT-4561		台湾慈湖蒋陵	2011/08/27
FJAT-4564		台湾桃园大溪九里香	2011/08/27
FJAT-4562		台湾慈湖黄花槐	2011/08/27
FJAT-4575		台湾中坜高速休息区	2011/08/29
FJAT-4574	新竹县	台湾新竹食品研究所	2011/08/29
FJAT-4576	苗栗县	台湾西湖高速休息区	2011/08/30
FJAT-4572	台中市	台湾大学农学院	2011/08/29
FJAT-4582	南投县	台湾中台寺	2011/08/27
FJAT-4577		台湾日月潭日潭	2011/08/30
FJAT-4579		台湾日月潭宏观寺	2011/08/30
FJAT-4583		台湾台一农场	2011/08/31
FJAT-4580	嘉义市	台湾嘉义大学草坪土	2011/08/31
FJAT-4587	高雄市	台湾高雄农友种业	2011/09/01
FJAT-4585		台湾高雄农友种业	2011/09/01

2. 芽胞杆菌的分离及保存

分别称取土壤样品 10g 至装有 90ml 无菌水的三角瓶中，振荡 20min，80℃水浴 10min（其间每隔 5min 振荡一次），即为 10^{-1} 浓度的土壤悬浮液；吸取 1ml 土壤悬浮液至装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-2} 浓度，再依次稀释成 10^{-3}、10^{-4}；各取 100μl 稀释液涂于 NA 平板上，每个梯度重复 3 次。30℃恒温箱培养 1～2d，统计平板上的菌落数，描述菌落形态、大小等，挑取单菌落，经多次纯化培养后，–80℃甘油保存待用。

3. 芽胞杆菌的 16S rDNA 鉴定

（1）仪器和试剂

仪器：UVP Gel Doc-It TS Imaging System 凝胶成像仪、Biometra 温度梯度 PCR 仪、PowerPac Basic BIO-RAD 电泳仪、离心机（Eppendorf Centrifuge 5418R）。PCR 扩增：采用细菌通用 16S rDNA 引物 9F 和 1542R，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应试剂：10×Buffer，dNTP（10mmol/L/管），*Taq* 酶（2.5U/μl）（上海博尚生物工程技术服务有限公司），100bp Marker（上海英骏生物技术有限公司）。DNA 提取试剂：100mmol/L NaCl，10mmol/L Tris/HCl，1mmol/L EDTA。

（2）芽胞杆菌 DNA 的提取及其 16S rDNA 序列的测定

采用酚氯仿法提取 DNA。采用细菌通用 16S rDNA 引物 9F 5′-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3′（9-27）和 1542R 5′-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3′（1542-1525）进行 16S rDNA 序列扩增（Yoon *et al.*，1997）。PCR 反应体系（25μL）：2.5μl 10× Buffer、0.5μl 10mmol/L dNTP、引物各 1μl、0.3μl（5U/μl）的 *Taq* 酶和 1μl DNA 模板。PCR 反应程序：94℃预变性 5min，94℃变性 30s，55℃退火 45s，72℃延伸 1min 30s，35 个循环，最后 72℃延伸 10min。PCR 产物的检测：取 2μl PCR 产物，点样于 1.5%的琼脂糖凝胶中，以 100bp Marker 作为标准分子质量，100V 电压，电泳 40min，EB 染色，用凝胶成像系统观察结果。PCR 产物由上海博尚生物技术有限公司进行测序。

（3）16S rRNA 序列数据分析

将各细菌 16S rDNA 序列测定的结果在 NCBI 上进行序列比对分析（Kim *et al.*，2012），并进行系统进化分析。在 GenBank 提交获得序列号。用 ClustalX 软件进行多重序列比对（Thompson *et al.*，1997），然后利用 Mega 4.0 软件构建系统进化树，采用 Neighbor-Joining 法进行聚类分析（Saitou and Nei，1987），同时 Bootstrap 取值 1000 次进行重复验证进化树的可靠性。

4. 芽胞杆菌种类多样性分析方法

对台湾地区从北向南各土壤样本和各市（县）芽胞杆菌种类及所占的比例进行统计，比较分析其分布规律。统计各样本和各市（县）的优势菌群、常见分布种类及特异性种类。选用 Shannom-Wiener 多样性指数（H）（孙海新和刘训理，2004）、Simpson 优势度指数（D）（王子璇等，2012）和 Pielou 均匀度指数（J）（孙海新和刘训理，2004）讨论各采集样本芽胞杆菌的多样性特征。多样性指数 H 的计算公式为：H=-$\sum P_i \ln P_i$，式

中，$P_i=N_i/N$，N_i 为处理 i 的芽胞杆菌种类数；N 为总芽胞杆菌种类。Simpson 优势度指数 D 的计算公式为：$D=1-\sum P_i^2$，P_i 指处理 i 的芽胞杆菌种类数占总芽胞杆菌的比例。Pielou 均匀度指数 J 的计算公式为：$H=-\sum P_i\ln P_i/\ln S$，S 为群落中芽胞杆菌的总种类数。台湾地区芽胞杆菌多样性的聚类分析，以芽胞杆菌种类为样本，以台湾各市（县）为指标构建矩阵，采用欧氏距离类平均聚类法，用 SPSS 软件运算，分析各种芽胞杆菌在各地区的分布范围；以芽胞杆菌种类为指标，台湾各市（县）为样本构建矩阵，用欧氏距离和类平均聚类法进行分析，用 SPSS 软件运算，以分析各地区芽胞杆菌种类特征。调查台湾地区芽胞杆菌的地理分布特征，对分离自台湾各市（县）的 78 株芽胞杆菌进行统计分析，用 16S rDNA 基因测序后通过 ClustalX 软件进行序列比对，用 Mega4.0 软件构建系统进化树，从系统进化方面对地理分布特征进行分析。

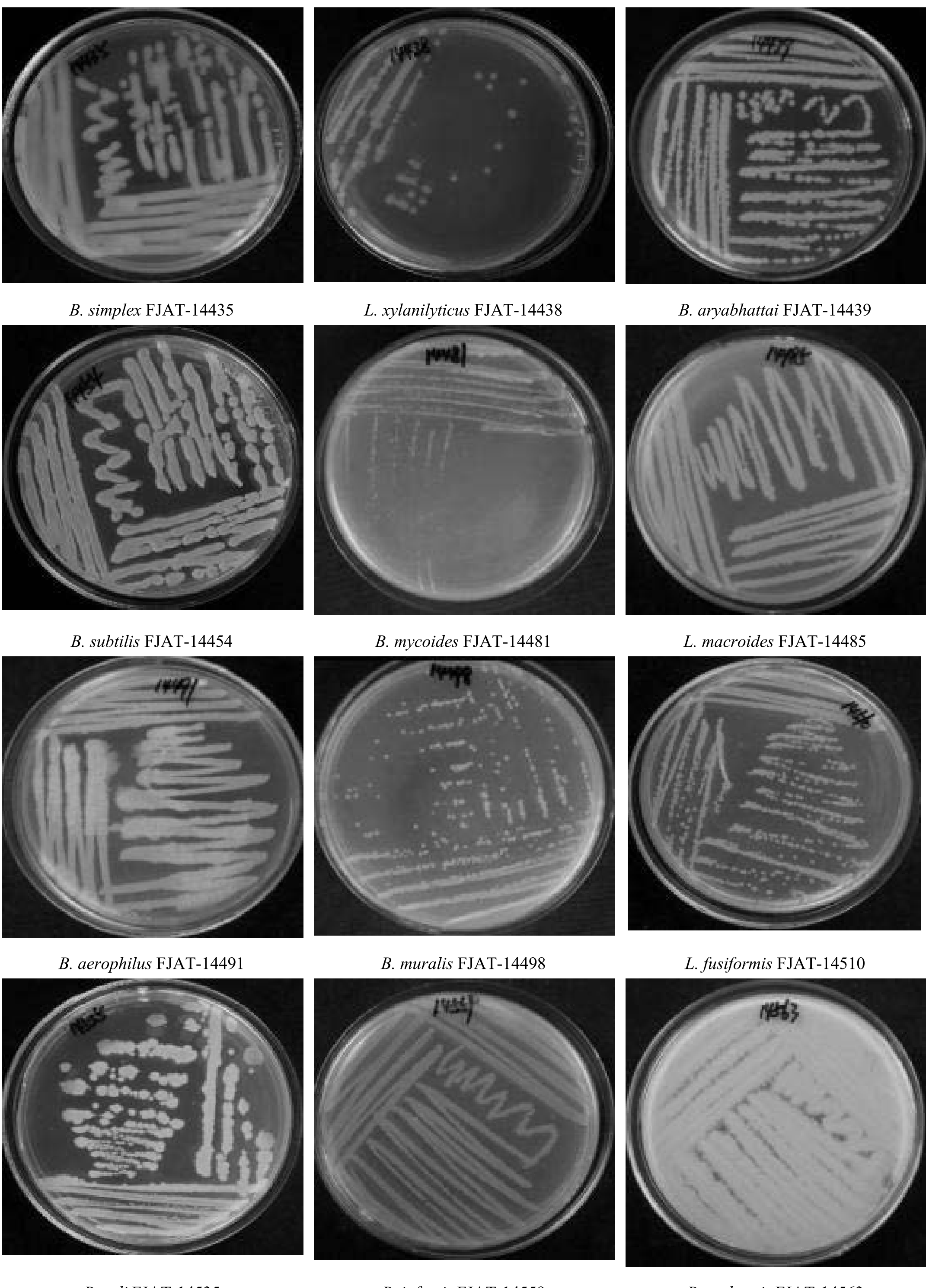
三、芽胞杆菌代表菌株菌落特征

从台湾 8 个市（县）采集的 20 份土样中，分离、保存芽胞杆菌 136 株。这些菌株的菌落大小、形态各异，从总体来看，可大致分为 21 类，各类形态的代表菌株详见图 4-41。从 21 个芽胞杆菌代表菌株的菌落可以看出芽胞杆菌在菌落形态上的多态性，各个菌株的菌落在颜色、大小、形状和表面粗糙程度等方面都互不相同：菌落颜色有黄色、白色、灰色和红色，表面有光滑和不光滑，大小不一，有扁平、突起之分。亲缘关系较近的菌株菌落形态也有差异，菌株 FJAT-14429 和 FJAT-14498 进化距离较近，菌落大小、颜色和光滑度均有差异。菌株 FJAT-14559 和 FJAT-14602 菌落形态几乎完全不同，但鉴定结果显示进化距离较近。许多形态相近的菌株却分为不同的种类，菌株 FJAT-14427 和 FJAT-14563 菌落形态几乎完全一样，分别被鉴定为假蕈状芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌，二者同为蜡状芽胞杆菌组菌株，亲缘关系比较近。菌株 FJAT-14435 和 FJAT-14454 菌落形态相近，鉴定结果分析显示进化距离较远。

B. pseudomycoides FJAT-14427

B. marisflavi FJAT-14428

B. asahii FJAT-14429



B. simplex FJAT-14435　　*L. xylanilyticus* FJAT-14438　　*B. aryabhattai* FJAT-14439

B. subtilis FJAT-14454　　*B. mycoides* FJAT-14481　　*L. macroides* FJAT-14485

B. aerophilus FJAT-14491　　*B. muralis* FJAT-14498　　*L. fusiformis* FJAT-14510

B. soli FJAT-14535　　*B. infantis* FJAT-14559　　*B. anthracis* FJAT-14563

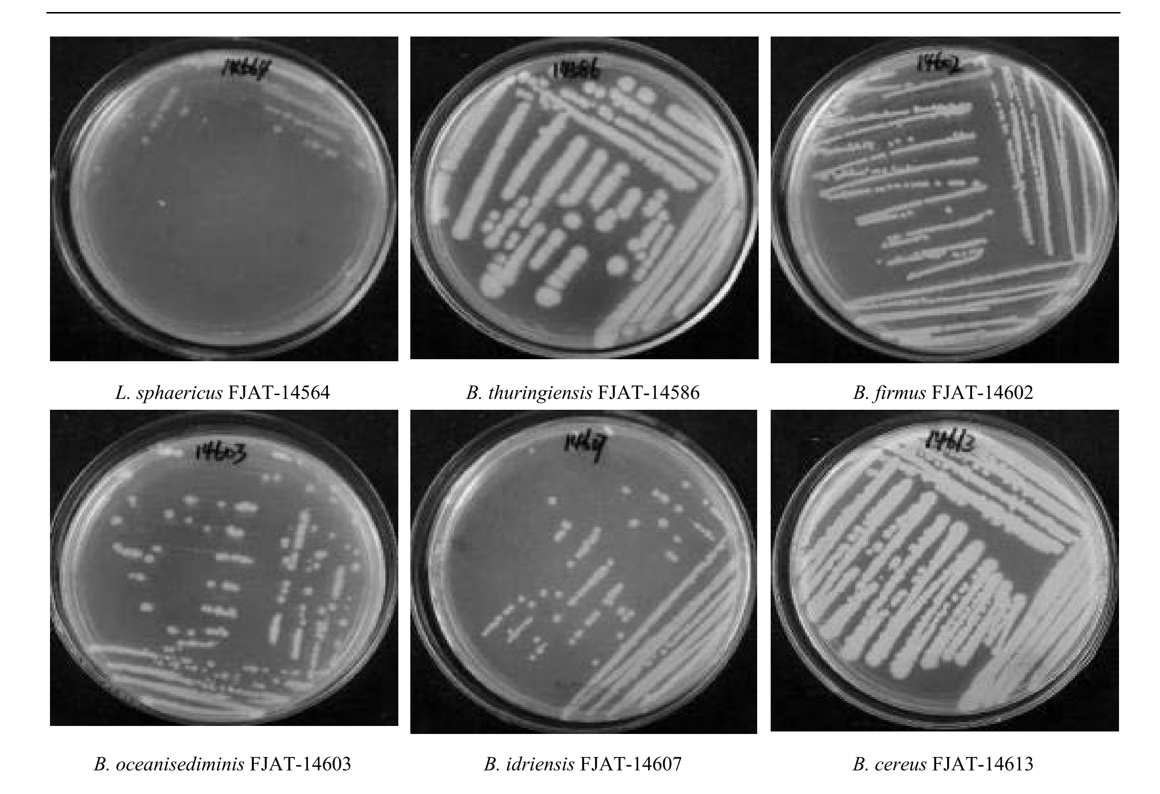


图 4-41　芽胞杆菌代表菌株菌落特征

四、芽胞杆菌种类分子鉴定

对分离得到的各芽胞杆菌进行总 DNA 提取和 16S rDNA 扩增，扩增出大约 1.5kb 的序列。扩增产物送至上海博尚生物技术有限公司进行测序。根据 16S rDNA 序列测定、比对的结果，将全部菌株鉴定为 21 个种（表 4-40），各 16S rDNA 序列已在 GenBank 获得序列号。

表 4-40　芽胞杆菌 16S rDNA 鉴定结果

菌株编号		学名	中文名称	16S rDNA GenBank 登录号	相似性/%
1	FJAT-14427	*B. pseudomycoides*	假蕈状芽胞杆菌	KC013911	100
2	FJAT-14428	*B. marisflavi*	黄海芽胞杆菌	KC013912	99.71
3	FJAT-14429	*B. asahii*	丰井氏芽胞杆菌	KC013913	99.87
4	FJAT-14435	*B. simplex*	简单芽胞杆菌	KC013914	100
5	FJAT-14438	*L. xylanilyticus*	解木糖赖氨酸芽胞杆菌	KC013915	99.86
6	FJAT-14439	*B. aryabhattai*	阿氏芽胞杆菌	KC013916	100
7	FJAT-14454	*B. subtilis*	枯草芽胞杆菌	KC013931	99.89

续表

菌株编号	学名	中文名称	16S rDNA GenBank 登录号	相似性/%
8　FJAT-14481	*B. mycoides*	蕈状芽胞杆菌	KC013917	97.98
9　FJAT-14485	*L. macroides*	延长赖氨酸芽胞杆菌	KC013918	99.37
10 FJAT-14491	*B. aerophilus*	嗜气芽胞杆菌	KC013919	100
11 FJAT-14498	*B. muralis*	壁芽胞杆菌	KC013920	100
12 FJAT-14510	*L. fusiformis*	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌	KC013921	100
13 FJAT-14535	*B. soli*	土壤芽胞杆菌	KC013922	98.51
14 FJAT-14559	*B. infantis*	婴儿芽胞杆菌	KC013923	99.81
15 FJAT-14563	*B. anthracis*	炭疽芽胞杆菌	KC013924	99.82
16 FJAT-14564	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌	KC013925	98.81
17 FJAT-14586	*B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌	KC013926	100
18 FJAT-14602	*B. firmus*	坚强芽胞杆菌	KC013927	98.86
19 FJAT-14603	*B. oceanisediminis*	海洋沉积芽胞杆菌	KC013928	98.95
20 FJAT-14607	*B. idriensis*	病研所芽胞杆菌	KC013929	100
21 FJAT-14613	*B. cereus*	蜡状芽胞杆菌	KC013930	100

五、芽胞杆菌采集种类系统发育

将21株芽胞杆菌及其对应参考菌株的16S rDNA序列通过ClustalX软件进行序列比对，用Mega4.0软件构建系统进化树，见图4-42。由图4-42可知，所有芽胞杆菌分为七大类，其中*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. anthracis*、*B. mycoides*和*B. pseudomycoides*聚在一起，均为蜡状芽胞杆菌组菌株，菌株FJAT-14563和菌株FJAT-14581分别鉴定为*B. anthracis*和*B. mycoides*，却没有和相应的参考菌株聚在一起，可见*B. thuringiensis*和*B. anthracis*亲缘关系非常接近。*B. subtilis*单独成一支，与蜡状芽胞杆菌组菌株距离很近，可见二者亲缘关系比较接近。*L. xylanilyticus*、*L. macroides*、*L. fusiformis*和*L. sphaericus*均为*Lysinibacillus*属菌株，聚在一起，其中*L. xylanilyticus*和*L. macroides*、*L. fusiformis*和*L. sphaericus*亲缘关系比较接近。*B. aerophilus*和*B. idriensis*聚在一起成一束，*B. marisflavi*单独成一支。*B. simplex*、*B. muralis*、*B. asahii*和*B. aryabhattai*聚在一起，其中*B. simplex*和*B. muralis*距离比较近。*B. soli*、*B. infantis*、*B. firmus*和*B. oceanisediminis*构成一个大的分支，*B. firmus*和*B. oceanisediminiss*构成一个分支，亲缘关系比较近，*B. soli*单独成一支。

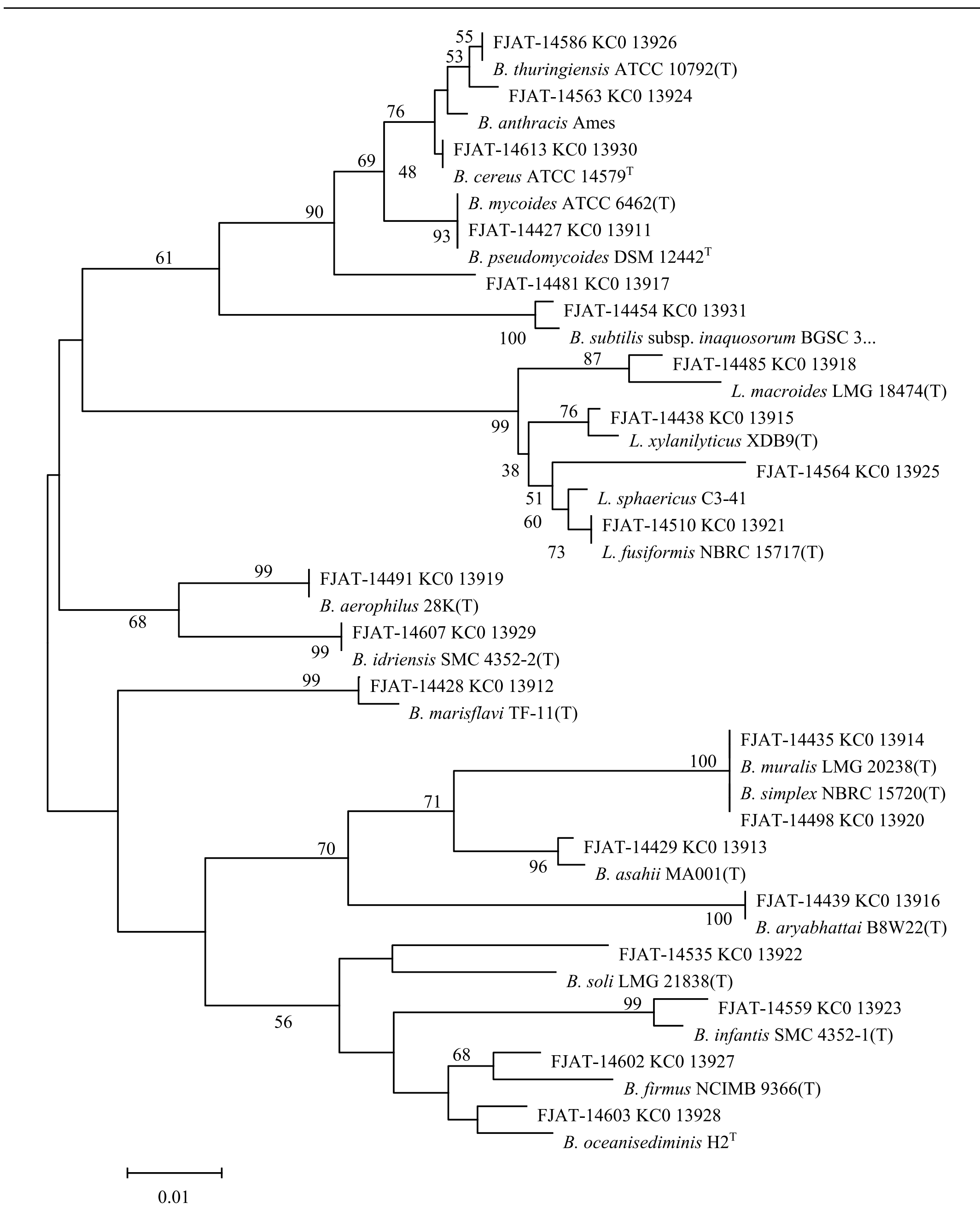


图 4-42　基于 16S rDNA 芽胞杆菌的系统发育

六、芽胞杆菌种类样本分布多样性

对台湾地区各土壤样本和各市（县）的芽胞杆菌种类及多样性进行统计分析的结果（表 4-41）表明，每个市（县）土壤样本分离出芽胞杆菌的种类数在总分离种类数中所占的比例基本相近，如台北市各土壤样本的比例均比较高，大部分为 24%～29%，南投

县各土壤样本的芽胞杆菌种类数大多占总种类数的 14%。

表 4-41　台湾地区各市（县）土壤样本芽胞杆菌种类数量分布

市（县）	土壤样本来源	种类数量	芽胞杆菌名称	样本种类百分含量/%
台北市	台北阳明山花钟	6	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*B. pseudomycoides*、*B. marisflavi*、*B. asahii*、*L. xylanilyticus*	29
	台北阳明山蒋介石雕像下	5	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*B. simplex*、*L. xylanilyticus*	24
	台北士林官邸芭乐树下	4	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*、*B. pseudomycoides*	20
	台北士林官邸白千层树下	5	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. pseudomycoides*、*B. simplex*、*B. subtilis*	24
	台北士林官邸草坪土	3	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*	14
桃园县	慈湖石像群	2	*B. cereus*、*B. aryabhattai*	10
	慈湖蒋陵	5	*B. cereus*、*B. aryabhattai*、*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*B. muralis*	24
	桃园大溪九里香	4	*B. cereus*、*B. aryabhattai*、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*	20
	慈湖黄花槐	5	*B. cereus*、*B. aryabhattai*、*B. thuringiensis*、*L. fusiformis*、*L. xylanilyticus*	24
	中坜高速休息区	3	*B. aryabhattai*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*	14
新竹县	新竹食品研究所	4	*B. thuringiensis*、*L. fusiformis*、*B. marisflavi*、*B. muralis*	20
苗栗县	西湖高速休息区	5	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. firmus*、*L. macrolides*、*B. infantis*	24
台中市	台湾大学农学院	6	*B. cereus*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. fusiformis*、*B. aerophilus*、*B. soli*	29
南投县	中台寺	3	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. xylanilyticus*	14
	日月潭日潭	3	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. mycoides*	14
	日月潭宏观寺	4	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. sphaericus*	20
	台一农场	3	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*	14
嘉义市	嘉义大学草坪土	6	*B. pseudomycoide*、*B. thuringiensis*、*B. firmus*、*B. idriensis*、*B. ceanisediminis*、*B. cereus*	29
高雄市	高雄农友种业	3	*B. pseudomycoides*、*B. aryabhattai*、*B. soli*	14
	高雄农友种业	4	*B. pseudomycoides*、*B. aryabhattai*、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*	20

七、芽胞杆菌种类县域分布多样性

对台湾各市（县）芽胞杆菌种类进行统计分析的结果（表 4-42）表明，从台北到高雄的 8 个市（县）的土壤中均含有 *B. thuringiensis*，可见 *B. thuringiensis* 是台湾土壤中的优势种，其中 5 个市（县）含有 *B. aryabhattai*、*B. cereus* 和 *B. anthracis*，2 个市（县）

有 *B. soli*，而 *B. simplex*、*B. asahii*、*B. subtilis*、 *B. aerophilus*、*L. macrolides*、*B. infantis* 和 *B. mycoides* 分别只在一个市（县）中有分布，为市（县）特异性芽胞杆菌。采集芽胞杆菌种类最多的市（县）为台北市和桃园县，分别占总采集种类的 48%和 38%。

台湾各市（县）芽胞杆菌平均种类统计结果见表 4-43，台湾地区芽胞杆菌平均种类变化趋势，除了在台北市、南投县和高雄市有所偏差，整体上呈现中部地区最多、从中间向南北两侧递减的趋势。

表 4-42 台湾各市（县）芽胞杆菌采集种类

市（县）	种类数量	芽胞杆菌名称	各地区种类百分含量/%
台北市	10	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*B. pseudomycoides*、*B. marisflavi*、*B. asahii*、*L. xylanilyticus*、*B. anthracis*、*B. simplex*、*B. cereus*、*B. subtilis*	48
桃园县	8	*B. cereus*、*B. aryabhattai*、*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*B. muralis*、*B. anthracis*、*L. fusiformis*、*L. xylanilyticus*	38
新竹县	4	*B. thuringiensis*、*L. fusiformis*、*B. marisflavi*、*B. muralis*	20
苗栗县	5	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. firmus*、*L. macrolides*、*B. infantis*	24
台中市	6	*B. cereus*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. fusiformis*、*B. aerophilus*、*B. soli*	29
南投县	7	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. xylanilyticus*、*B. anthracis*、*B. mycoides*、*L. sphaericus*、*B. cereus*	33
嘉义市	6	*B. pseudomycoide*、*B. thuringiensis*、*B. firmus*、*B. idriensis*、*B. oceanisediminis*、*B. cereus*	20
高雄市	5	*B. pseudomycoides*、*B. aryabhattai*、*B. soli*、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*	24

表 4-43 台湾各市（县）芽胞杆菌平均种类数

种类学名	中文学名	台北市	桃园县	新竹县	苗栗县	台中市	南投县	嘉义市	高雄市
B. thuringiensis	苏云金芽胞杆菌	0.80	0.80	1.00	1.00	1.00	0.75	1.00	0.50
B. aryabhattai	阿氏芽胞杆菌	1.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.75	0.00	1.00
B. cereus	蜡状芽胞杆菌	0.20	0.80	0.00	0.00	1.00	0.25	1.00	0.00
B. anthracis	炭疽芽胞杆菌	0.60	0.20	0.00	1.00	0.00	0.75	0.00	0.50
B. pseudomycoides	假蕈状芽胞杆菌	0.60	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
L. fusiformis	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌	0.00	0.20	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50
L. xylanilyticus	解木糖赖氨酸芽胞杆菌	0.20	0.40	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00
B. muralis	壁芽胞杆菌	0.00	0.20	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. marisflavi	黄海芽胞杆菌	0.20	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. firmus	坚强芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00
B. simplex	简单芽胞杆菌	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. asahii	风井氏芽胞杆菌	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. subtilis	枯草芽胞杆菌	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

续表

种类学名	中文学名	台北市	桃园县	新竹县	苗栗县	台中市	南投县	嘉义市	高雄市
B. soli	土壤芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00
B. aerophilus	嗜气芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
L. macrolides	延长赖氨酸芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. infantis	婴儿芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. mycoides	蕈状芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00
L. sphaericus	球形赖氨酸芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00
B. idriensis	病研所芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00
B. ceanisediminis	海洋沉积芽胞杆菌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00
总和	—	4.40	3.80	4.00	5.00	6.00	3.25	6.00	3.50

八、芽胞杆菌种类分布多样性

台湾地区多样性指数平均值（高昆等，2008）较低的为桃园县、南投县和高雄市，其芽胞杆菌采集种类多样性指数分别为 1.8458、1.6888 和 1.7925，其次为新竹县、台北市和苗栗县，多样性指数分别为 2.0000、2.1628 和 2.3219，台中市和嘉义市的芽胞杆菌采集种类多样性指数相同为 2.5850。所有样本的均匀度指数和优势度指数均为 1.0000（表 4-44）。

表 4-44　台湾各市（县）样本芽胞杆菌采集种类多样性

样本编号	样本来源	菌种数	多样性指数（*H*）	多样性指数平均值
FJAT-4570	台北市	6	2.5850	2.1628
FJAT-4569		5	2.3220	
FJAT-4568		4	2.0000	
FJAT-4566		5	2.3220	
FJAT-4567		3	1.5850	
FJAT-4559	桃园县	2	1.0000	1.8458
FJAT-4561		5	2.3220	
FJAT-4564		4	2.0000	
FJAT-4562		5	2.3220	
FJAT-4575		3	1.5850	
FJAT-4574	新竹县	4	2.0000	2.0000
FJAT-4576	苗栗县	5	2.3220	2.3220
FJAY-4572	台中市	6	2.5850	2.5850
FJAT-4582	南投县	3	1.5850	1.6888
FJAT-4577		3	1.5850	
FJAT-4579		4	2.0000	

续表

样本编号	样本来源	菌种数	多样性指数（*H*）	多样性指数平均值
FJAT-4583		3	1.5850	
FJAT-4580	嘉义市	6	2.5850	2.5850
FJAT-4585	高雄市	3	1.5850	1.7925
FJAT-4587		4	2.0000	

台湾地区芽胞杆菌多样性指数平均值变化趋势显示，除了在台北市、南投县和高雄市有所变化外，从整体上看，多样性指数平均值变化趋势表现为从中部向南北两侧逐渐递减，这与台湾各市（县）芽胞杆菌平均种类统计结果变化趋势一致。

台湾地区芽胞杆菌在各土壤样品中分布的统计结果（表 4-45）表明，*B. aryabhattai* 的分布最广，在 6 个市（县）的 17 份土壤样品中均存在；其次为蜡状芽胞杆菌组菌株，而 *B. simplex*、*B. asahii*、*B. subtilis*、*B. soli*、*B. aerophilus*、*L. macrolides*、*B. infantis* 和 *B. mycoides* 分别只在一个土壤样品中有分布，为土壤样品的特异性芽胞杆菌。

表 4-45　台湾地区各市（县）芽胞杆菌分布

种类学名	中文学名	菌株编号
B. aryabhattai	阿氏芽胞杆菌	FJAT-14424[1]、FJAT-14426[1]、FJAT-14433[2]、FJAT-14434[2]、FJAT-14446[3]、FJAT-14451[4]、FJAT-14452[4]、FJAT-14592[5]、FJAT-14539[6]、FJAT-14514[7]、FJAT-14489[8]、FJAT-14490[8]、FJAT-14513[9]、FJAT-14439[10]、FJAT-14440[10]、FJAT-14555[12]、FJAT-14556[12]、FJAT-14557[12]、FJAT-14530[13]、FJAT-14532[13]、FJAT-14533[13]、FJAT-14534[13]、FJAT-14505[14]、FJAT-14562[16]、FJAT-14565[16]、FJAT-14524[17]、FJAT-14525[17]、FJAT-14527[17]
B. thuringiensis	苏云金芽胞杆菌	FJAT-14425[1]、FJAT-14448[3]、FJAT-14483[8]、FJAT-14442[10]、FJAT-14496[11]、FJAT-14497[11]、FJAT-14531[13]、FJAT-14502[14]、FJAT-14478[15]、FJAT-14597[20]
B. pseudomycoides	假蕈状芽胞杆菌	FJAT-14427[1]、FJAT-14447[3]、FJAT-14453[4]、FJAT-14455[4]、FJAT-14516[7]
B. marisflavi	黄海芽胞杆菌	FJAT-14428[1]、FJAT-14500[11]
B. asahii	风井氏芽胞杆菌	FJAT-14429[1]
B. anthracis	炭疽芽胞杆菌	FJAT-14436[2]、FJAT-14591[5]、FJAT-14486[8]、FJAT-14488[8]、FJAT-14479[15]、FJAT-14560[16]、FJAT-14563[16]、FJAT-14522[17]
L. xylanilyticus	解木糖赖氨酸芽胞杆菌	FJAT-14438[2]、FJAT-14520[9]、FJAT-14441[10]、FJAT-14503[14]
B. simplex	简单芽胞杆菌	FJAT-14449[4]
B. subtilis	枯草芽胞杆菌	FJAT-14454[4]
B. cereus	蜡状芽胞杆菌	FJAT-14541[6]、FJAT-14542[6]、FJAT-14512[9]、FJAT-14529[13]、FJAT-14521[17]、FJAT-14606[18]
L. fusiformis	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌	FJAT-14510[9]、FJAT-14518[11]
B. muralis	壁芽胞杆菌	FJAT-14498[11]

续表

种类学名	中文学名	菌株编号
L. macrolides	延长赖氨酸芽胞杆菌	FJAT-14553[12]
B. firmus	坚强芽胞杆菌	FJAT-14558[12]、FJAT-14602[18]
B. infantis	婴儿芽胞杆菌	FJAT-14559[12]
B. aerophilus	嗜气芽胞杆菌	FJAT-14528[13]
B. soli	土壤芽胞杆菌	FJAT-14535[13]
L. sphaericus	球形赖氨酸芽胞杆菌	FJAT-14564[16]
B. oceanisediminis	海洋沉积芽胞杆菌	FJAT-14603[18]
B. idriensis	病研所芽胞杆菌	FJAT-14607[18]

注：表中株菌编号后加编号为[1]～[20]样本编号

九、芽胞杆菌的地理分化

为了调查台湾地区芽胞杆菌的地理分布特征，对分离到的 3 种芽胞杆菌，即 *B. aryabhattai*、*B. thuringiensis* 和 *B. anthracis*，根据其 16S rDNA 序列，通过 ClustalX 软件进行序列比对，用 Mega4.0 软件构建系统进化树（图 4-43）。

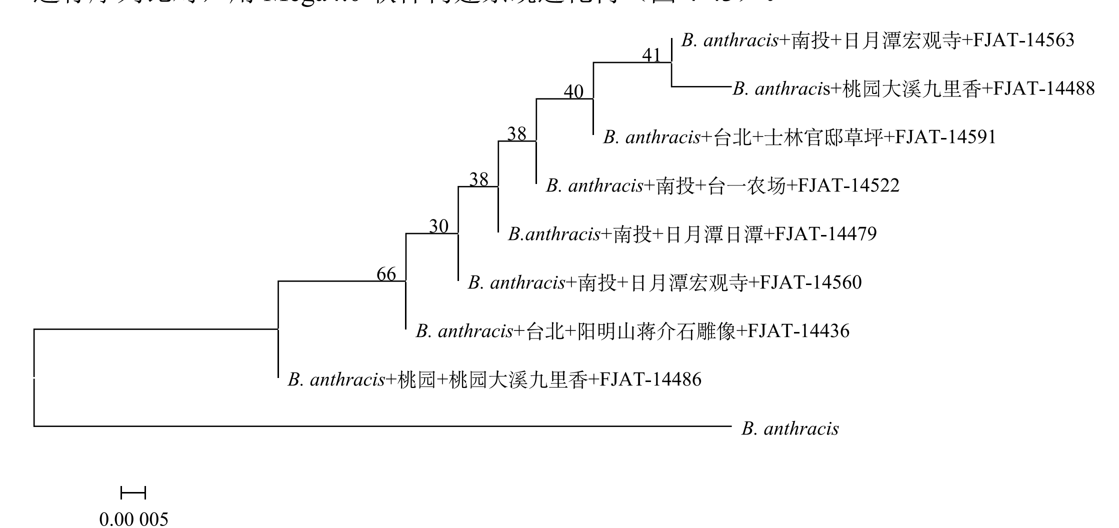


图 4-43　炭疽芽胞杆菌的 16S rDNA 聚类分析图

1. 炭疽芽胞杆菌种群的地理分化

基于 16S rDNA 序列，将在台湾地区不同市（县）采集的炭疽芽胞杆菌（*B. anthracis*）种群进行聚类分析（图 4-43）。*B. anthracis* 种群可以分化为两个分支，一个分支为 *B. anthracis* 的对照菌株，另一个分支为台湾地区采集的样本。结果表明，台湾地区采集的 *B. anthracis* 种群与对照菌株比较，都发生了一定程度的地理分化。同一个地理位置采集的 *B. anthracis* 种群，可以产生较大的分化，如在桃园大溪九里香植物土壤中采集的

B. anthracis FJAT-14488 和 FJAT-14486，差异很大，前者靠近南投的种群，后者靠近台北的种群。

不同地理位置采集的 *B. anthracis* 种群，可以差异很小，如桃园大溪九里香植物土壤中采集的 *B. anthracis* FJAT-14488 和南投日月潭宏观寺采集的 *B. anthracis* FJAT-14563 聚类在一起。综上所述，*B. anthracis* 种群地理分化呈现出如下规律：①整个台湾地区 *B. anthracis* 种群与 *B. anthracis* 对照种群存在明显的地理分化；②同一个地理位置采集的 *B. anthracis* 种群，可以存在显著的差异，也可以差异很小；③不同地理位置采集的 *B. anthracis* 种群，可以差异很小，也可以差异很大。

2. 苏云金芽胞杆菌种群的地理分化

基于 16S rDNA 序列，将在台湾地区不同市（县）采集的苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）种群进行聚类分析（图 4-44）。*B. thuringiensis* 种群可以分化为两个分支，一个分支与 *B. thuringiensis* ATCC-10792 的对照菌株形成一组，另一个分支为台湾地区采集的样本形成一组。结果表明，台湾地区采集的 *B. thuringiensis* 种群与对照菌株比较，一部分未发生显著的地理分化，包括桃园大溪 FJAT-14483、台北阳明山 FJAT-14425、高雄农友种业公司 FJAT-14597、南投中台寺 FJAT-14502、台北台湾大学农学院 FJAT-14531、南投日月潭 FJAT-14479 等；另一部分发生显著的地理分化，包括了桃园高速休息区 FJAT-14442、新竹食品研究所 FJAT-14497、台北士林官邸 FJAT-14448 等。综上所述，*B. thuringiensis* 种群地理分化呈现出如下规律：①台湾地区 *B. thuringiensis* 种群与 *B. thuringiensis* 对照种群可以存在明显的地理分化，也可以无显著差异；②同一个地理位置采集的 *B. thuringiensis* 种群，可以存在显著的差异，也可以差异很小；③不同地理位置采集的 *B. thuringiensis* 种群，可以差异很小，也可以差异很大。

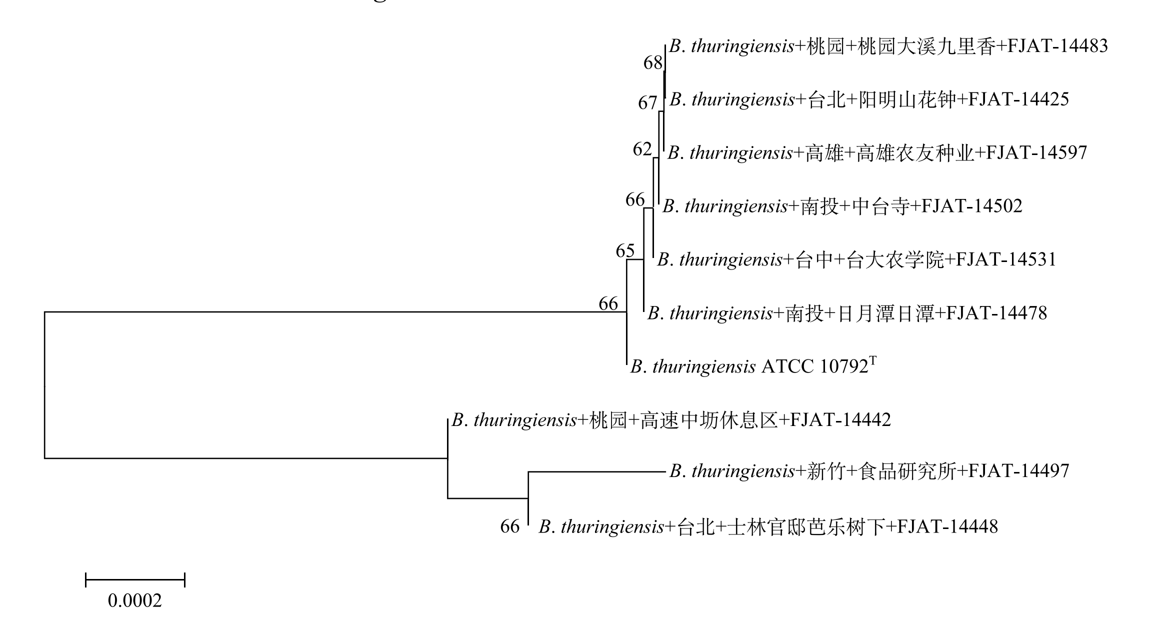


图 4-44　苏云金芽胞杆菌的 16S rDNA 聚类分析图

3. 阿氏芽胞杆菌种群的地理分化

基于 16S rDNA 序列，将在台湾地区不同市(县)采集的阿氏芽胞杆菌(*B. aryabhattai*)种群进行聚类分析（图 4-45）。*B. aryabhattai* 种群可以分化为两个分支，一个分支与

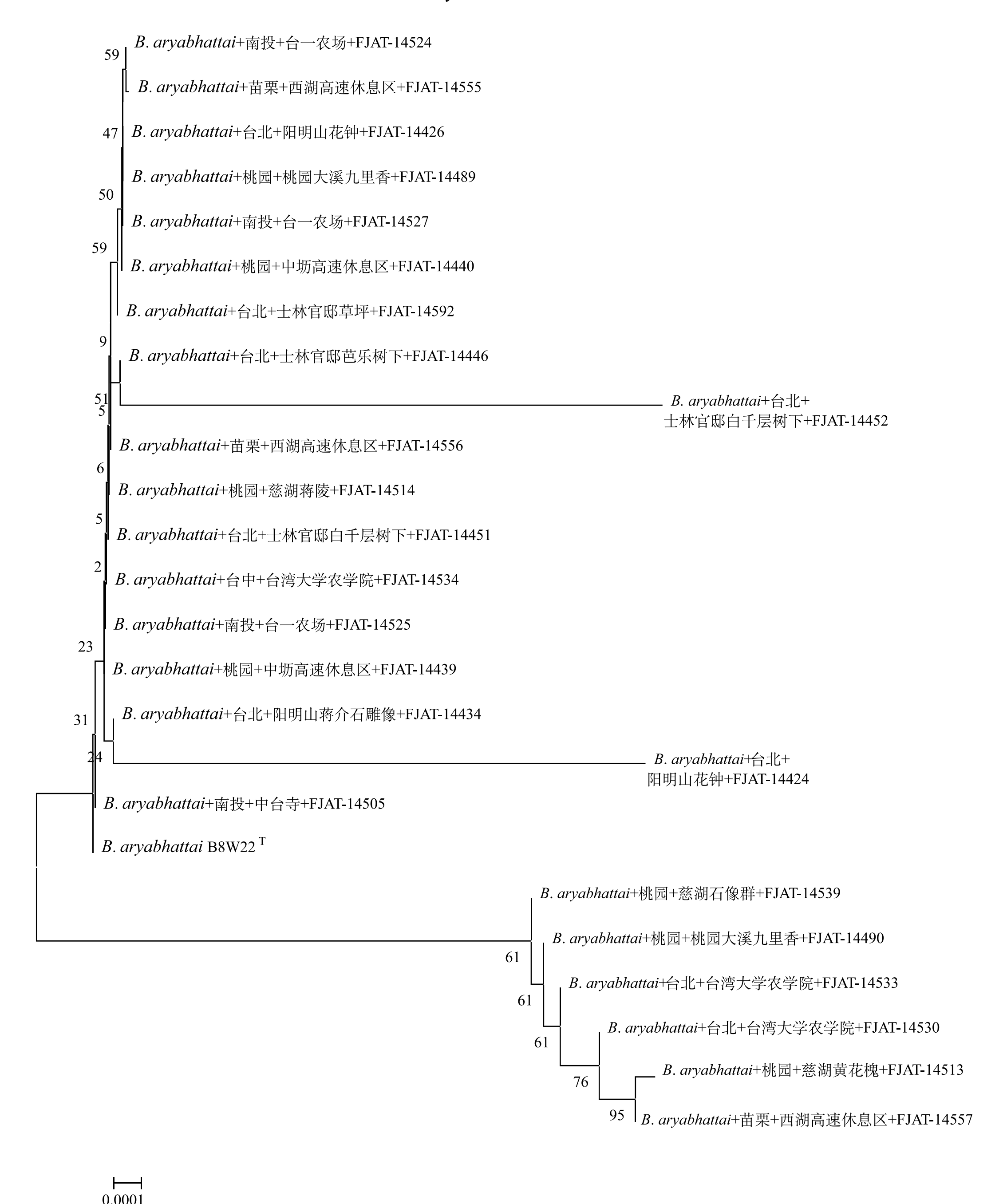


图 4-45　阿氏芽胞杆菌的 16S rDNA 聚类分析图

B. aryabhattai B8W22 的对照菌株形成一组，包括 18 个地点采集的菌株，其中 16 个菌株与对照菌株的地理分化差异不大，有两个菌株即台北士林官邸 FJAT-14452 和台北阳明山 FJAT-14424 与对照菌株存在着较大的地理分化；另一个分支为台湾地区采集的 6 个地点样本形成一组，采集地点为台北、桃园、苗栗等。结果表明，台湾地区采集的 *B. aryabhattai* 种群与对照菌株比较，一部分未发生显著的地理分化，另一部分发生显著的地理分化，综上所述，*B. aryabhattai* 种群地理分化呈现出如下规律：①台湾地区 *B. aryabhattai* 种群与 *B. aryabhattai* 对照种群可以存在明显的地理分化，也可以无显著差异；②同一个地理位置采集的 *B. aryabhattai* 种群，可以存在显著的差异，也可以差异很小；③不同地理位置采集的 *B. thuringiensis* 种群，可以差异很小，也可以差异很大。

4. 芽胞杆菌种类地理分布聚类分析

以芽胞杆菌种类为样本，以台湾各市（县）为指标，构建矩阵，用欧氏距离和类平均聚类法对芽胞杆菌种类在各市（县）的分布进行分析，结果见图 4-46。芽胞杆菌可聚为 4 类，其中 *B. thuringiensis* 和 *B. aryabhattai* 各为一类，分布于所有采集地点；*B. cereus* 为一类，分布于大部分的采集地；其余的种类为一类，它们的分布范围比较窄，只在特殊的地区有分布。

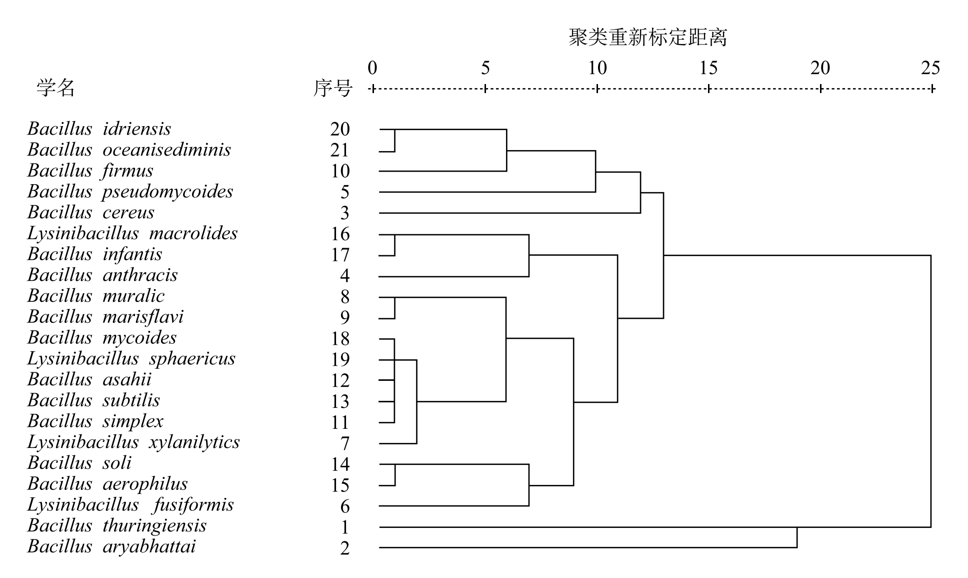


图 4-46　以芽胞杆菌种类为样本的台湾地区芽胞杆菌种类聚类分析图

5. 不同地理位置芽胞杆菌种类分布的聚类分析

以芽胞杆菌种类为指标，以台湾各市（县）为样本，构建矩阵，用欧氏距离和类平均聚类法对台湾地区各市（县）的芽胞杆菌种类分布进行分析，结果见图 4-47。当 λ=20 时，可将台湾地区各市（县）聚为 3 类，台中县和嘉义县各成一类，该类的特点为采集样本的芽胞杆菌平均种类较多；其余市（县）为一类，特点为采集的芽胞杆菌种类较少，其中又以桃园县和南投县的芽胞杆菌平均种类最少。

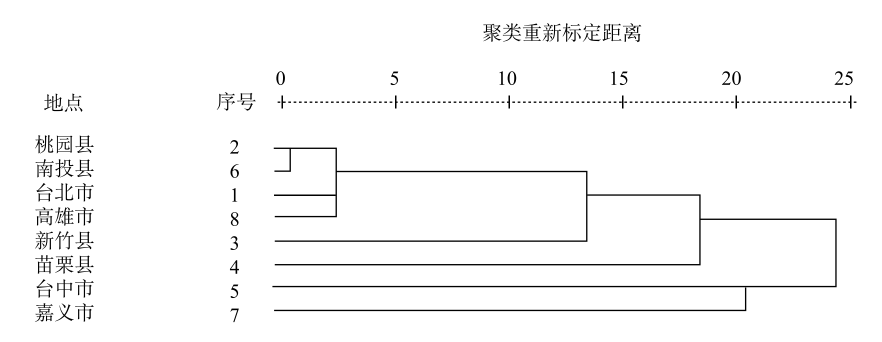


图 4-47　台湾地区芽胞杆菌种类以台湾各市（县）为样本的聚类分析

十、讨论

1. 基于土壤样本的台湾地区芽胞杆菌种类特殊性

本研究从台湾各市（县）均分离到具有地区特异性的芽胞杆菌，多数未见有在台湾地区分离到的报道。自从 Shivaji 等（2009）首次发表 *B. aryabhattai* 新种以来，不断有 *B. aryabhattai* 被分离自各种生境中，Antony 等（2012）首次报道了从南极洲东部沿海陆地的冰芯上分离到 *B. aryabhattai*，该菌株有可能是通过运输进入冰芯，其生存可能与海盐浓度等因素有关。Lee 等（2012）在贫瘠的湖畔地区，从一种常见的野生植物根际分离到 *B. aryabhattai*，证明它在植物生长中发挥有益作用。Lv 等（2012）在中国大陆红曲糯米酒传统发酵启动器中分离到 *B. aryabhattai* 菌株。Yang 等（2012）在中国滇池流域磷肥沃的土壤中也分离到 *B. aryabhattai*，可见 *B. aryabhattai* 的分布是比较广泛的。在台湾地区，目前仅有在紫丁香蘑栽培后的废弃基质、荷兰泥炭苔和石灰的混合物中分离到 *B. aryabhattai* 菌株的报道，尚未见到在台湾本土土壤中分离到该菌株的其他研究报道。本研究在台湾大部分土样中都分离到 *B. aryabhattai* 菌株。

B. asahii 首次分离自日本（Yumoto *et al.*，2004），其亲缘关系与 *B. simplex* 比较近，与本节鉴定结果一致，在中国大陆地区尚未见报道。*B. aerophilus* 分离自用于收集高海拔空气样本的冻存管中（Shivaii *et al.*，2006），目前也未见在其他地方分离到的报道，本研究在台湾地区分离到该种类。*L. macroides* 是 2012 年最新发表的芽胞杆菌新种（Coorevits *et al.*，2012），该菌株的样本早在 1947 年分离自牛粪中，但一直没有被分类在细菌之列，16S rDNA 基因序列分析显示，*L. macroides* 在基因组水平与近源种 *L. xylanilyticus*、*L. boronitolerans* 及 *L. fusiformis* 的相似性不是很高，但多项分析证明其为 *Lysinibacillus* 属菌株，尚未见其他报道，本研究在台湾地区分离到该种类。*B. infantis* 和 *B. idriensis* 是 2006 年发表的新种（Ko *et al.*，2006），分离自新生儿败血症患者，*B. infantis* 与 *B. firmus* 进化关系较近，与本节鉴定结果一致，目前未见在台湾地区土壤中分离到的报道，本研究在台湾地区的土壤中分离到。*B. marisflavi* 首次分离鉴定自韩国黄海之滨的潮间带（Yoon *et al.*，2003），目前仅有在真菌菌袋中分离到的报道（陈俏彪等，2011），本研究在台湾地区的土壤中分离到。*B. oceanisediminis* 是 2010 年发表的一个新种（Zhang *et al.*，2010），分离自中国南海的沉积物中，基于 16S rDNA 的系统发育分析表明，其与 *B. firmus* 进化关系接

近，与本节鉴定结果一致，未见其他报道，本研究在台湾地区的土壤中分离到。

2. 基于采样样本的台湾地区芽胞杆菌区系调查

土壤是芽胞杆菌的主要来源，各种土壤环境中都存在芽胞杆菌菌群，草地、山地、平原等土壤细菌的优势菌群均为芽胞杆菌（胡容平等，2010；徐辉等，2012）。本实验调查结果显示，台湾芽胞杆菌种类最多的市（县）为台北市和桃园县，可能与其所处的地理位置有关，为台湾地区的最北边。其次芽胞杆菌种类较多的为南投县，可能与其生态环境有关，因为南投县为台湾唯一不靠海的县。台中地区苗栗县和台中市及新竹县和嘉义市的芽胞杆菌种类分布比较均匀。可能受气候因素的影响，台湾中部亚热带季风气候的界线向南偏移的主要影响因素有海陆分布、地形地势、纬度位置和洋流因素等。各地区总芽胞杆菌种类和平均种类分布有一定的差异，可能是由生境所致。土壤养分、含水量、pH、土壤肥力、理化因子、生态环境及地理分布等特性决定了芽胞杆菌的多样性。许多植物根系可培养细菌优势菌群为芽胞杆菌菌群（于翠等，2007；罗菲等，2011），且大部分具生防功能（杨敬辉等，2009），不同生境芽胞杆菌种类多样性丰富度也不同（徐辉等，2012）。龚国淑等（2009）对成都市郊区 27 个样点表层土样的芽胞杆菌进行分离鉴定，研究了该地区土壤芽胞杆菌的空间分布特征。结果表明，成都郊区土壤芽胞杆菌较丰富，空间分布总体上呈条带状分布和局部团块状，从西南向东北方向呈递增趋势。刘秀花等（2006）为调查河南省土壤中芽胞杆菌资源，从河南省不同地区的土壤中分离纯化需氧芽胞杆菌，获得 415 株纯培养物，并且鉴定到 14 个不同的芽胞杆菌菌种。分析发现，不同农作区的优势菌种种类及其检出率不同，与地理条件和耕作制度有一定关系。石春芝等（2001）也对神农架自然保护区九大湖中的芽胞杆菌进行了研究，分析了其主要芽胞杆菌种类及其分布。

3. 基于采样样本的台湾地区芽胞杆菌种类多态性

本研究分离鉴定获得的 21 种芽胞杆菌，其中苏云金芽胞杆菌为台湾的优势芽胞杆菌菌群，在各个地区均分离到，阿氏芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌为次要芽胞杆菌菌群，各地区也有其特异性芽胞杆菌。对台湾地区从北向南各市（县）芽胞杆菌种类多样性及其分布规律的分析表明，除个别地区外，台湾地区各市（县）芽胞杆菌多样性指数平均值变化趋势总体上呈中间最大、向两边递减的趋势，可见土壤中芽胞杆菌的多样性是由地理、生境等诸多因素决定的。例如，某些作物间作可改变盐碱土根际微生物群落结构组成，提高根际微生物群落多样性（李鑫等，2012；路京等，2012）；植物根系分泌物可影响根系微生物的行为和选择根系微生物种群结构（Badri *et al.*，2009）。因此，受土壤条件、植物群落和气候条件等因子的影响，芽胞杆菌的种类、数量和动态分布，会按一定的生态规律产生差异（张薇等，2005）。刘训理等（2006）对烟草根系微生物研究表明，在土壤肥沃和中等的条件下，细菌类群的多样性和丰富度较大，而贫瘠土壤细菌类群的优势度较大。郑贺云等（2012）也研究了新疆阿克苏地区盐碱土样中细菌类群的多样性和优势种群，以及其与环境因子的相关性，结果表明新疆阿克苏地区土壤中的微生物丰富度非常高，存在大量的细菌类群且优势菌群不尽相同，盐碱土样中

微生物群落结构与环境因子密切相关。

4. 基于采样样本的台湾地区芽胞杆菌种类分布特点

本研究从台湾土样中分离的芽胞杆菌经过 16S rDNA 序列测序鉴定后，鉴定出的 21 个种从北向南种类多样性分析表明，*B. thuringiensis* 是台湾土样中的优势种，其次为 *B. aryabhattai*、*B. cereus* 和 *B. anthracis*，*B. simplex*、*B. asahii*、*B. subtilis*、*B. soli*、*B. aerophilus*、*L. macrolides*、*B. infantis* 和 *B. mycoides* 等均为地区特异性芽胞杆菌。其中，*B. aryabhattai* 存在于台湾的大部分地区，而已经分离的菌株大部分分离自上层平流和沿海冰芯等靠近海岸或极端特殊环境中，可见 *B. aryabhattai* 在台湾地区的分布在很大程度上受台湾环境和地理的影响。地区特异性菌株 *B. asahii* 分离自台北市，即台湾的最北部，而该菌分离源来自日本，可能是由环境条件的相似或菌株的运输所致。*B. aerophilus* 分离自台中市，该地区处于台湾中部，地势比较高，与分离自收集高海拔空气样本的冻存管的菌株的生境有一定的相似性。*B. marisflavi* 和 *B. oceanisediminis* 等地区特异性菌株均分离自海滨地区，这和台湾四面环海、地势高峻陡峭、位于环太平洋的火山地震带、自然资源丰富、地处热带及亚热带地区等因素有关。此外，调查台湾地区芽胞杆菌的地理分布特征也表明，鉴定为同一地区的同种芽胞杆菌均聚在一起，不同种芽胞杆菌由于进化距离比较接近，分离鉴定自同一地区的也会聚在一起。可见同一地区的芽胞杆菌在进化过程中由于共同的生境或影响因子存在某种进化相关性，赖氨酸芽胞杆菌组菌株的分布却显示了不同的分布进化特征。总之，台湾的气候、地形、土壤等环境因素造就了台湾独特的生态环境，影响了芽胞杆菌分布的多态性，使其具有较高的物种歧异度。但生态类型丰富多样，因此，要对台湾地区土壤中芽胞杆菌多样性进行精确具体的调查，需要搜集更加全面的信息作进一步分析。

第八节　武夷山地区芽胞杆菌种类分布多样性

一、概述

1. 芽胞杆菌多样性研究

芽胞杆菌由于其能产生抗高温、干燥、紫外线、电离辐射和有毒化学物质的芽胞（刘国红等，2011）而广泛分布于土壤、水体和动植物体表，在极端环境下，如温泉（Yazdani *et al.*，2009）、沙漠（Köberl *et al.*，2011）、南极（Timmery *et al.*，2011）、盐田（Shi *et al.*，2011）、火山（Kim *et al.*，2011）、矿藏（Valverde *et al.*，2011）、深海（Gartner *et al.*，2011）等都发现有芽胞杆菌分布。近年来，关于土壤芽胞杆菌的研究陆续有报道。

苏云金芽胞杆菌在我国 13 个自然保护区森林土壤中广泛分布，其数量和分布与水热条件、土壤 pH、地理位置等密切相关（戴莲韵等，1993；1994）。对我国南北方 12 个省土壤中苏云金芽胞杆菌的调查显示，苏云金芽胞杆菌的丰富度由南向北呈逐渐增加趋势，苏云金芽胞杆菌的分布与植被类型没有特异相关（戴顺英等，1996）。我国西北干

旱地区 11 个自然保护区土壤芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌分布的研究表明，芽胞杆菌广泛分布于森林土壤，数量和分布规律与环境水热、养分等综合生态因子有关（王学聘等，1999）。芽胞杆菌是滇池底泥中的主要优势种，并且分布特点与水质状况密切相关（樊竹青和叶华，2001）。在红壤生态系统下，林地的芽胞杆菌多样性程度最高，其次是旱地，再次是水田，最低是侵蚀地（张华勇等，2003）。辽宁省苏云金芽胞杆菌资源丰富，检出率为大田作物覆盖的土壤最高，其次是林木，最少是花卉（曲慧东等，2008）。刘秀花等（2006）调查了河南省土壤中的芽胞杆菌资源，发现不同农作区的优势菌种类与地理条件和耕作制度相关。天津市土壤中苏云金芽胞杆菌的调查结果显示，苏云金芽胞杆菌适于在土质疏松、透气性好的林区土壤中生长，其杀虫特性受地域、气候等因素影响显著（魏雪生等，2006）。芽胞杆菌是成都市郊区土壤细菌中的主要类群，并且含有具有生防潜力的菌株（唐志燕等，2005；龚国淑等，2009）。谢月霞等（2008）和苏旭东等（2007）分别调查了河北省不同生态区的苏云金芽胞杆菌，结果表明河北省苏云金芽胞杆菌资源具有丰富的多样性，*cry* 基因类型复杂多样，产生的伴胞晶体形态各异。河北省大茂山地区的苏云金芽胞杆菌资源丰富，出菌量随海拔升高呈先升高后降低规律，部分菌株对铜绿丽金龟幼虫具有极高毒力（宋健等，2011）。四川盆地土壤中含有丰富的苏云金芽胞杆菌资源，山林土的苏云金芽胞杆菌出菌率高于农田土（周长梅等，2011）。王子旋等（2012）对新疆 4 个地点土壤的芽胞杆菌进行调查，结果显示新疆芽胞杆菌较为丰富，不同采样地点芽胞杆菌的种类和数量都有较大差异。河北省五岳寨国家森林公园的苏云金芽胞杆菌资源丰富，具有良好的多态性（代萌等，2013）。

2. 武夷山芽胞杆菌多样性研究

福建武夷山国家自然保护区位于福建省北部，处于武夷山、建阳、邵武和光泽 4 县市的交界处（117°27′～117°51′E，27°35′～27°54′N），面积 565km^2，拥有世界同纬度现存面积最大、保存最完整的中亚热带森林生态系统，以“生物模式标本”名扬海内外。保护区平均海拔 1200m，主峰为黄岗山，海拔 2158m。武夷山国家自然保护区属典型的中亚热带季风气候，年平均气温 13～19℃，年均相对湿度 82%～85%，年均降水量 1600～2200mm。保护区土壤属于亚热带酸性山地森林土壤类型，土壤分区属红黄壤区。海拔 700m 以下为红壤，700～1050m 为红黄壤，1050～1900m 为黄壤，1900m 以上为山地草甸土（雷寿平和黄梅玲，2005）。

近年来，研究人员对武夷山国家自然保护区的生物多样性进行了大量的研究，多样性研究的对象包括植物（李振基等，2002；何健源等，2004；王良桂和徐晨，2010）、昆虫（汪家社，2006，2007）、贝类（周卫川等，2011）、微生物（庄铁成等，1997，1998）等。纵观前人的研究，关于武夷山国家自然保护区芽胞杆菌分布多样性的研究较少，本研究对武夷山国家自然保护区土壤中芽胞杆菌的种类、数量、分布及地理分化等进行调查，为了解芽胞杆菌的分布和发掘芽胞杆菌资源提供参考。研究的技术路线见图 4-48。

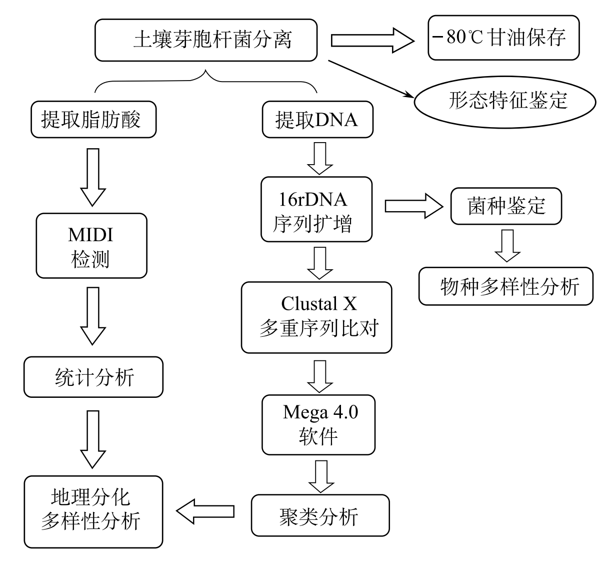


图 4-48　技术路线

二、研究方法

1. 采样方法

在武夷山国家自然保护区内的不同海拔、不同植被条件下，采用五点法采集 0～30cm 内的土壤。采集的土样装入保鲜袋带回实验室；将采回的土样风干，装入土样保存塑料瓶中备用。土壤样本采集信息见表 4-46 和图 4-49。

表 4-46　土样采样信息

土样编号	采集地点	土样信息	采集时间
FJAT-5619	黄岗山顶	SJ-1 黄岗山顶土壤	2012/6/19
FJAT-5622		SJ-5 黄岗山顶土壤	2012/6/19
FJAT-5733		SJ-12 黄岗山边土	2012/6/19
FJAT-5735		SJ-8 黄岗山松树根际土	2012/6/19
FJAT-5738		SJ-13 黄岗山苔藓土	2012/6/19
FJAT-5744		黄岗山顶杂草地土壤	2012/6/19
FJAT-5745		黄岗山顶水塘边土壤 1#	2012/6/19
FJAT-5754		黄岗山顶岩石下土壤	2012/6/19
FJAT-5755		黄岗山顶树下土壤	2012/6/19
FJAT-5756		黄岗山顶矮松下土壤	2012/6/19
FJAT-5762		黄岗山顶福建界碑下土壤 1#	2012/6/19
FJAT-5763		黄岗山顶江山界碑下土壤	2012/6/19
FJAT-5765		黄岗山顶武夷山天下第一峰牌下土壤 1#	2012/6/19

续表

土样编号	采集地点	土样信息	采集时间
FJAT-5766	黄岗山顶	黄岗山顶土壤 ③	2012/6/19
FJAT-5768		黄岗山山最顶土壤 ⑤	2012/6/19
FJAT-5818		SJ-2 黄岗山草地土壤	2012/6/19
FJAT-5819		SJ-3 黄岗山草地土壤	2012/6/19
FJAT-5820		SJ-7 黄岗山烂草根土壤	2012/6/19
FJAT-5821		SJ-9 黄岗山石头旁边土	2012/6/19
FJAT-5825		黄岗山顶草坪土壤 ⑩	2012/6/19
FJAT-5626	黄岗山中部	SJ-18 黄岗山中部土壤 ②	2012/6/19
FJAT-5627		SJ-22 树下土	2012/6/19
FJAT-5654		SJ-59 树下土	2012/6/19
FJAT-5668		SJ-19 苔藓地衣土壤	2012/6/19
FJAT-5750		黄岗山屋前草丛土壤	2012/6/19
FJAT-5751		黄岗山窗户下地衣土壤	2012/6/19
FJAT-5759		黄岗山发射塔下土壤 2#	2012/6/19
FJAT-5764		黄岗山牌下土壤	2012/6/19
FJAT-5726		黄岗山水泥厂地土壤 1#	2012/6/19
FJAT-5748		黄岗山墙角土壤 3#	2012/6/19
FJAT-5761		黄岗山草丛边沙地土壤 1#	2012/6/19
FJAT-5826		黄岗山发射塔下土壤 1#	2012/6/19
FJAT-5828	黄岗山脚	黄岗山水塘边土壤②	2012/6/19
FJAT-5628		SJ-24 黄岗山土壤 3	2012/6/19
FJAT-5629		SJ-27 黄岗山土壤 3	2012/6/19
FJAT-5630		SJ-28 黄岗山土壤 3	2012/6/19
FJAT-5631		SJ-29 黄岗山土壤	2012/6/19
FJAT-5632		SJ-30 黄岗山土壤 3	2012/6/19
FJAT-5633		SJ-31 水中沙土	2012/6/19
FJAT-5634		SJ-32 黄岗山土壤 3	2012/6/19
FJAT-5635	桐木关	SJ-41 桐木关柳杉表面土 4	2012/6/19
FJAT-5636		SJ-42 桐木关银杏烂树叶土	2012/6/19
FJAT-5640		SJ-49 桐木关红豆杉洞内土壤 4	2012/6/19
FJAT-5699		桐峰茶丁志中红茶基地茶园土 1	2012/6/19
FJAT-5700		桐峰茶丁志中枯木下土壤	2012/6/19
FJAT-5701		桐峰茶丁志中棕榈树下土壤	2012/6/19
FJAT-5702		桐峰茶丁志中南方红豆杉根际土壤	2012/6/19
FJAT-5703		桐峰茶丁志中大松树下土壤 1	2012/6/19
FJAT-5704		桐峰茶场溪边土壤	2012/6/19

续表

土样编号	采集地点	土样信息	采集时间
FJAT-5708	桐木关	桐木关城墙下土壤 2	2012/6/19
FJAT-5709		桐木关城门边土壤 1	2012/6/19
FJAT-5710		瀑布下土样 1#	2012/6/19
FJAT-5786	挂墩	中挂敦黄花菜边土	2012/6/20
FJAT-5787		挂敦路口斜坡上土	2012/6/20
FJAT-5788		挂敦路口朝阳坡上土	2012/6/20
FJAT-5789		挂敦路口土壤 ②	2012/6/20
FJAT-5790		中挂敦路边石头边土	2012/6/20
FJAT-5791		挂敦路口土壤 ③	2012/6/20
FJAT-5794		中挂敦河边土	2012/6/20
FJAT-5795		挂敦路口土壤 ④	2012/6/20
FJAT-5796		中挂敦石头下土	2012/6/20
FJAT-5798		挂敦路口土壤 ⑥	2012/6/20
FJAT-5802		挂敦路口土壤 ⑤	2012/6/20
FJAT-5804		挂敦路口⑦石头上土	2012/6/20
FJAT-5805		挂墩路口茶树根际土	2012/6/20
FJAT-5806		挂墩路口阴面土	2012/6/20
FJAT-5568	大竹岚	大竹岚半山腰岩壁土 1#	2012/6/20
FJAT-5576		大竹岚半山腰松树根系土 2#⑤	2012/6/20
FJAT-5577		大竹岚半山腰润兰科根系土 1#	2012/6/20
FJAT-5581		大竹岚半山腰树下蘑菇根系土	2012/6/20
FJAT-5583		大竹岚半山腰沉积土 1#	2012/6/20
FJAT-5585		大竹岚蕨类根系土 1#	2012/6/20
FJAT-5589		大竹岚岩石下土壤	2012/6/20
FJAT-5590		大竹岚瞭楼苔藓土壤	2012/6/20
FJAT-5591		大竹岚瞭望台周边土 1#	2012/6/20
FJAT-5594		大竹岚米珍树下土 3#	2012/6/20
FJAT-5595		大竹岚木兰属根系土	2012/6/20
FJAT-5597		大竹岚茶树根系土 1	2012/6/20
FJAT-5601		大竹岚土壤 17	2012/6/20
FJAT-5605		大竹岚竹子根系土 3#	2012/6/20
FJAT-5609		大竹岚侧柏土样 14（上）	2012/6/20
FJAT-5610		大竹岚牛藤土样（上）	2012/6/20
FJAT-5612		大竹岚枫香根系土 1#	2012/6/20
FJAT-5613		大竹岚银杏树下土 1#	2012/6/20
FJAT-5615		大竹岚车前草边土	2012/6/20
FJAT-5616		大竹岚腐质土 1#	2012/6/20

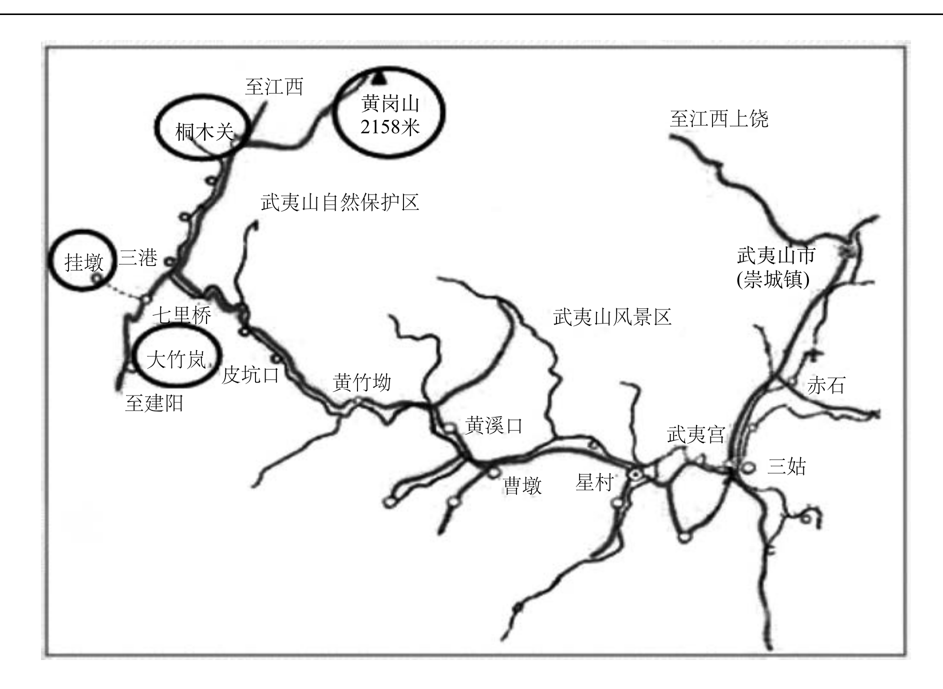


图 4-49　武夷山国家自然保护区土壤样本采集地点示意图

2. 土壤中芽胞杆菌的分离与保存

称取土样 10g，加入到装有 90ml 无菌水的锥形瓶（150ml）内，摇床振荡 20min 后，80℃水浴 10～15min，中间振荡 2～3 次，即制成土壤悬液原液。吸取 1ml 土壤悬液原液至装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-2} 浓度，依次稀释配置成 10^{-3}、10^{-4}。超净台内，吸取稀释度为 10^{-3}、10^{-4} 的土壤悬液 100μl，加入到 LB 培养基平板上，用无菌涂布棒涂布均匀，每个稀释度重复 2 次。将涂布均匀的培养基平板倒置放在 30℃恒温箱培养 1～2d。统计平板上的菌落数，描述菌落形态、大小等，算出每一稀释度菌落的平均数（菌落数计算公式：每克土样中微生物的数量＝同一稀释度的菌落平均数×稀释倍数 / 含菌样品克数）。用平板划线法纯化菌株，用接种环在 NA 平板上挑取单菌落在新的平板上划线，放置在 30℃恒温箱中培养（可能需重复划线培养多次，直至得到纯化菌株）。对纯化后的菌株进行编号、拍照，–80℃甘油保存。

3. 芽胞杆菌的分子鉴定

（1）芽胞杆菌总 DNA 的提取

从菌种库中取出需要活化的菌株在 NA 平板上划线，30℃培养 2d。刮取 1～2 环的菌体于 1.5ml 离心管中，用 400μl STE Buffer（100mmol/L NaCl、10mmol/L Tris/HCl、1mmol/L EDTA，pH8.0）吹打悬浮细胞两次，8000r/min 离心 2min，弃上清。用 200μL TE Buffer（10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA，pH8.0）悬浮细胞后，加入 100μl Tris-saturated phenol（pH8.0），涡旋混合 60s，4℃ 13 000r/min 离心 5min，取 160μl 上清液转移到干净的 1.5ml 离心管中。加入 40μl TE Buffer，再用 100μl 氯仿混合，4℃ 13 000r/min 离心

5min。取160μl上清液到干净的1.5ml 离心管中，再加入40μL TE和5μl RNase（10mg/ml）并在37℃下放置10min后加入100μl氯仿，4℃ 13 000r/min离心5min。将150μl的上清液转移到干净的1.5ml 离心管中。

（2）16S rDNA PCR扩增与测序分析

PCR反应体系（25μl）：2.5μl 10× Buffer、0.5μl 10mmol/L dNTP、引物各1μl、0.3μl（5U/μl）*Taq*酶、1μl DNA模板。PCR反应程序：94℃ 预变性5min，94℃变性30s，55℃ 退火45s，72℃ 延伸1min 30s，35个循环，最后72℃延伸10min。PCR产物的检测：取2μL PCR产物，点样于1.5%的琼脂糖凝胶中，以100bp Marker作为标准分子质量，100V电压，电泳40min，EB染色，用凝胶成像系统观察结果。检测出有条带的菌株PCR产物送至上海博尚生物技术有限公司进行测序。将测定出的各菌株16S rRNA 序列，经ClustalX软件对齐后，通过软件Mega4.0（Tamura *et al.*，2004，2007）进行聚类分析（方法为Neighbour-Joining，Bootstrap值取1000），构建聚类树。

4. 芽胞杆菌多样性分析方法

分离频度是指某种芽胞杆菌出现的频率（邓小军等，2011），分离频度=某个种出现的样品数/总样品数×100%，分离频度大于50%为优势种，介于30%～50%的为最常见种，介于10%～30%的为常见种，小于10%的为稀有种（张英等，2003）。通过计算分离频度来划分一个地区的优势种。使用常用物种多样性指数Margalef丰富度指数、Pielou均匀度指数、Shannon-Wiener多样性指数和Simpson优势度指数讨论不同海拔采样点芽胞杆菌物种多样性，应用大型统计软件PRIMER 5.0计算各物种多样性指数（李捷等，2012），公式如下。

Margalef丰富度指数（D_{MA}）： $D_{MA}=（S-1）/\ln N$

Pielou均匀度指数（J'）： $J'=H'/\ln S$

Shannon-Wiener多样性指数（H'）： $H'=-\sum P_i \ln P_i$

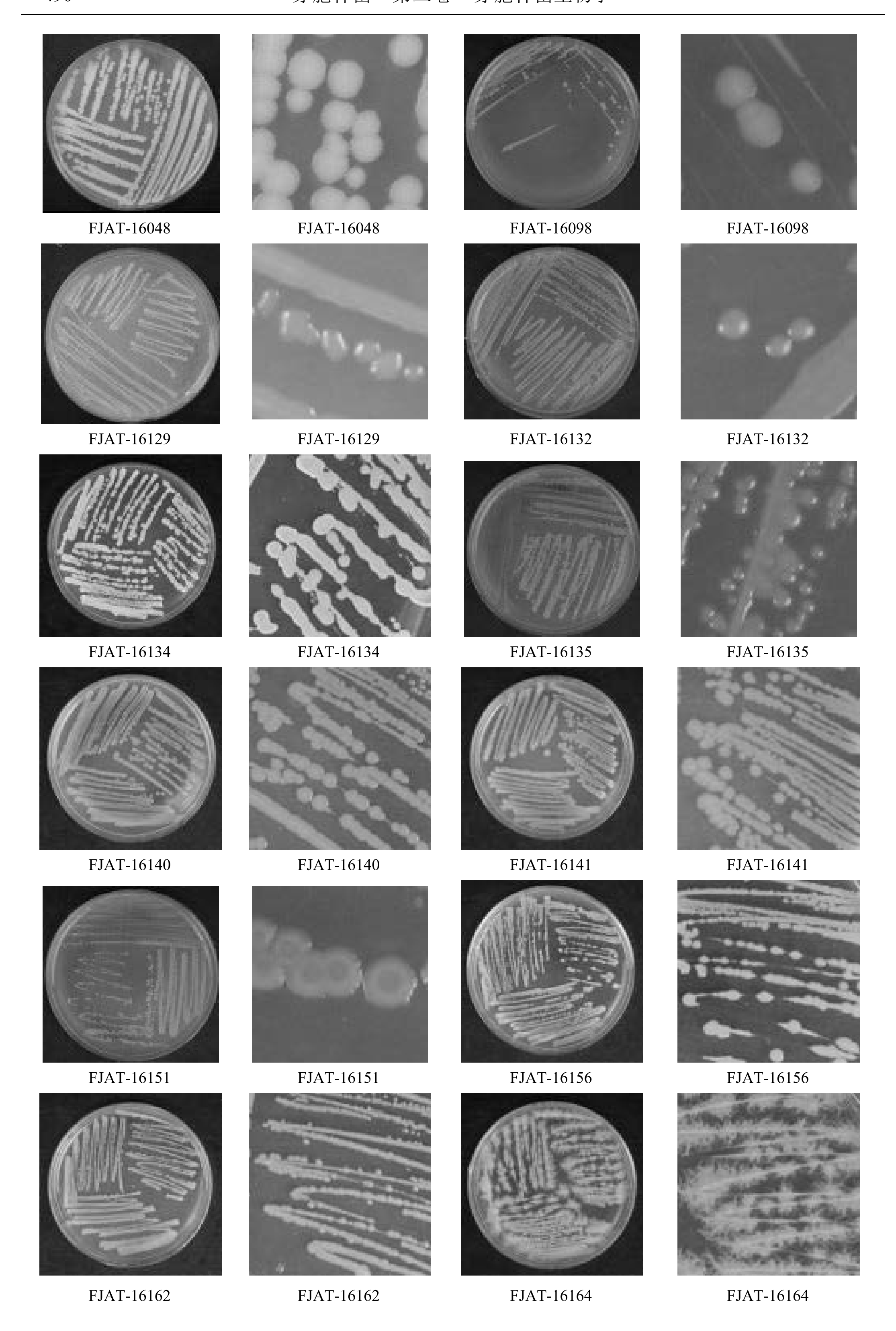
Simpson优势度指数（D_J）： $D_J=1-\sum P_i^2$

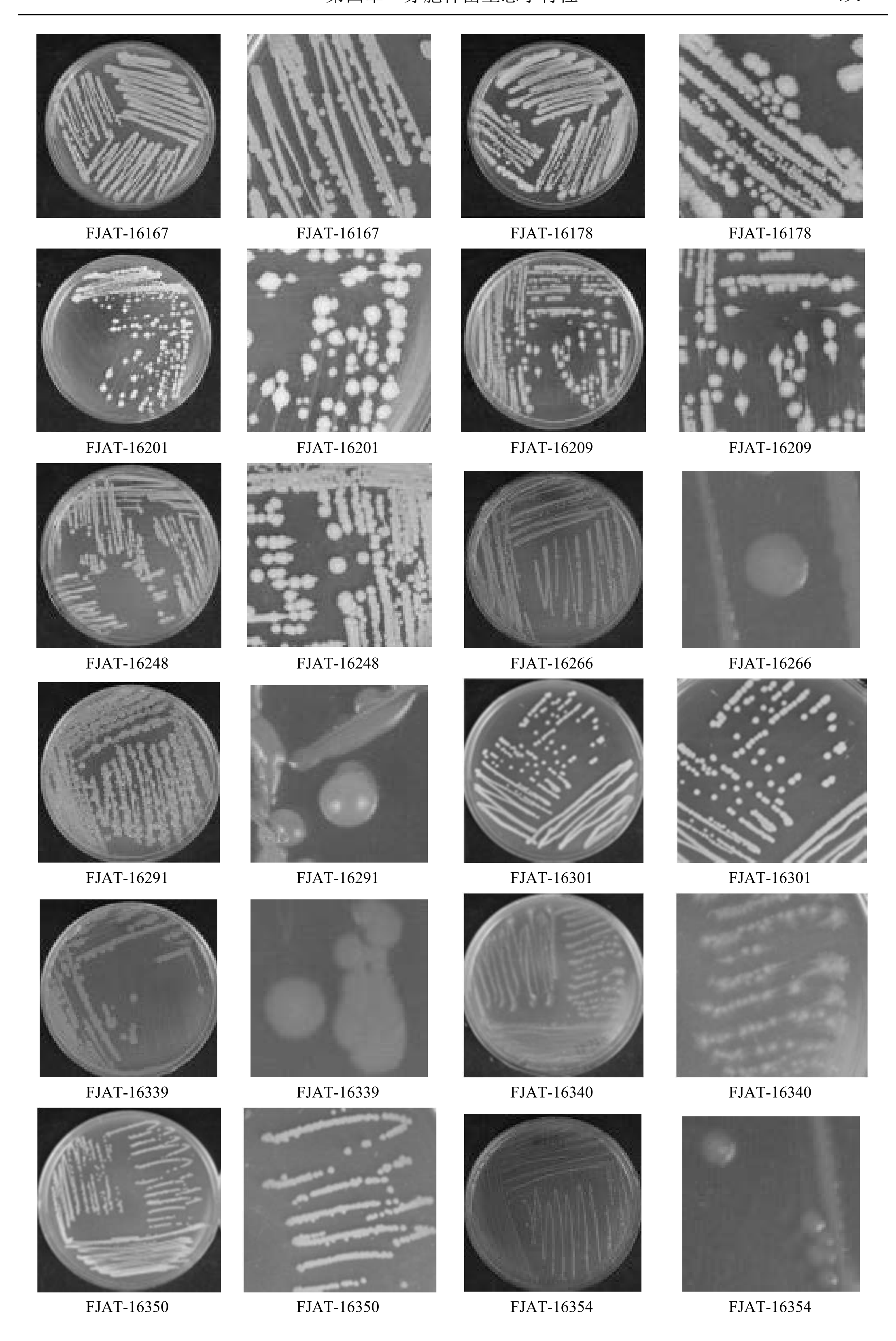
式中，S为总芽胞杆菌种类数；N为芽胞杆菌个体总数；P_i是第i种的个体数占总个体数的比例（张华勇等，2003）。挑选优势菌的16S rDNA序列分析其地理分化，经ClustalX对齐后，通过软件Mega4.0进行聚类（方法为Neighbour-Joining，Bootstrap值取1000），使用DNAMAN 6.0.3.99软件对分离株与参考菌株16S rDNA序列进行多重比对，讨论差异性。

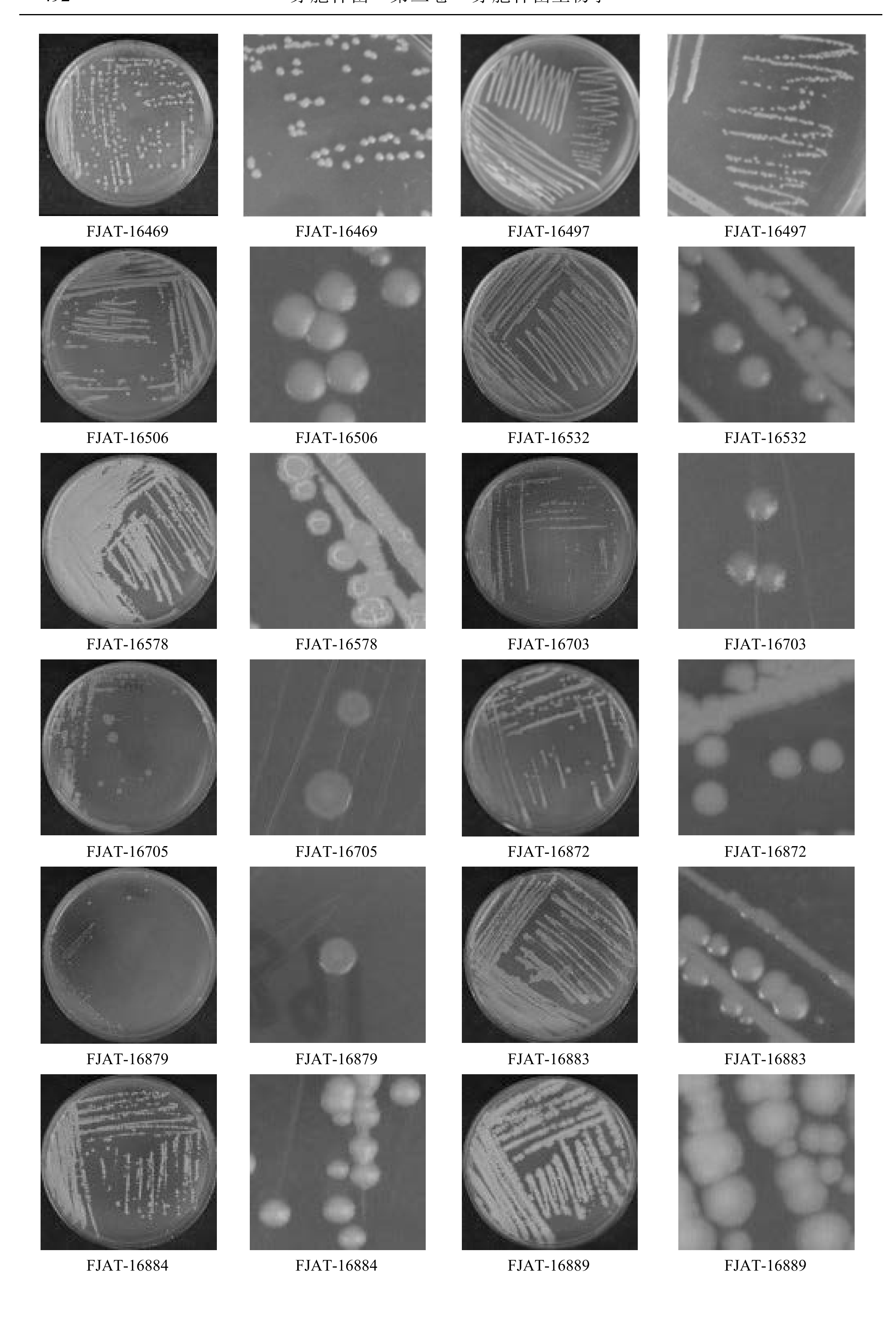
三、芽胞杆菌种类采集

1. 菌落形态

从武夷山国家自然保护区采集的86份土样中分离、保存芽胞杆菌434株。这些菌株的菌落大小不一、形态各异，总体来看大致可分为43类，各类代表菌株的菌落形态见图4-50。


FJAT-16048
FJAT-16048
FJAT-16098
FJAT-16098
FJAT-16129
FJAT-16129
FJAT-16132
FJAT-16132
FJAT-16134
FJAT-16134
FJAT-16135
FJAT-16135
FJAT-16140
FJAT-16140
FJAT-16141
FJAT-16141
FJAT-16151
FJAT-16151
FJAT-16156
FJAT-16156
FJAT-16162
FJAT-16162
FJAT-16164
FJAT-16164


FJAT-16167
FJAT-16167
FJAT-16178
FJAT-16178
FJAT-16201
FJAT-16201
FJAT-16209
FJAT-16209
FJAT-16248
FJAT-16248
FJAT-16266
FJAT-16266
FJAT-16291
FJAT-16291
FJAT-16301
FJAT-16301
FJAT-16339
FJAT-16339
FJAT-16340
FJAT-16340
FJAT-16350
FJAT-16350
FJAT-16354
FJAT-16354


FJAT-16469
FJAT-16469
FJAT-16497
FJAT-16497
FJAT-16506
FJAT-16506
FJAT-16532
FJAT-16532
FJAT-16578
FJAT-16578
FJAT-16703
FJAT-16703
FJAT-16705
FJAT-16705
FJAT-16872
FJAT-16872
FJAT-16879
FJAT-16879
FJAT-16883
FJAT-16883
FJAT-16884
FJAT-16884
FJAT-16889
FJAT-16889

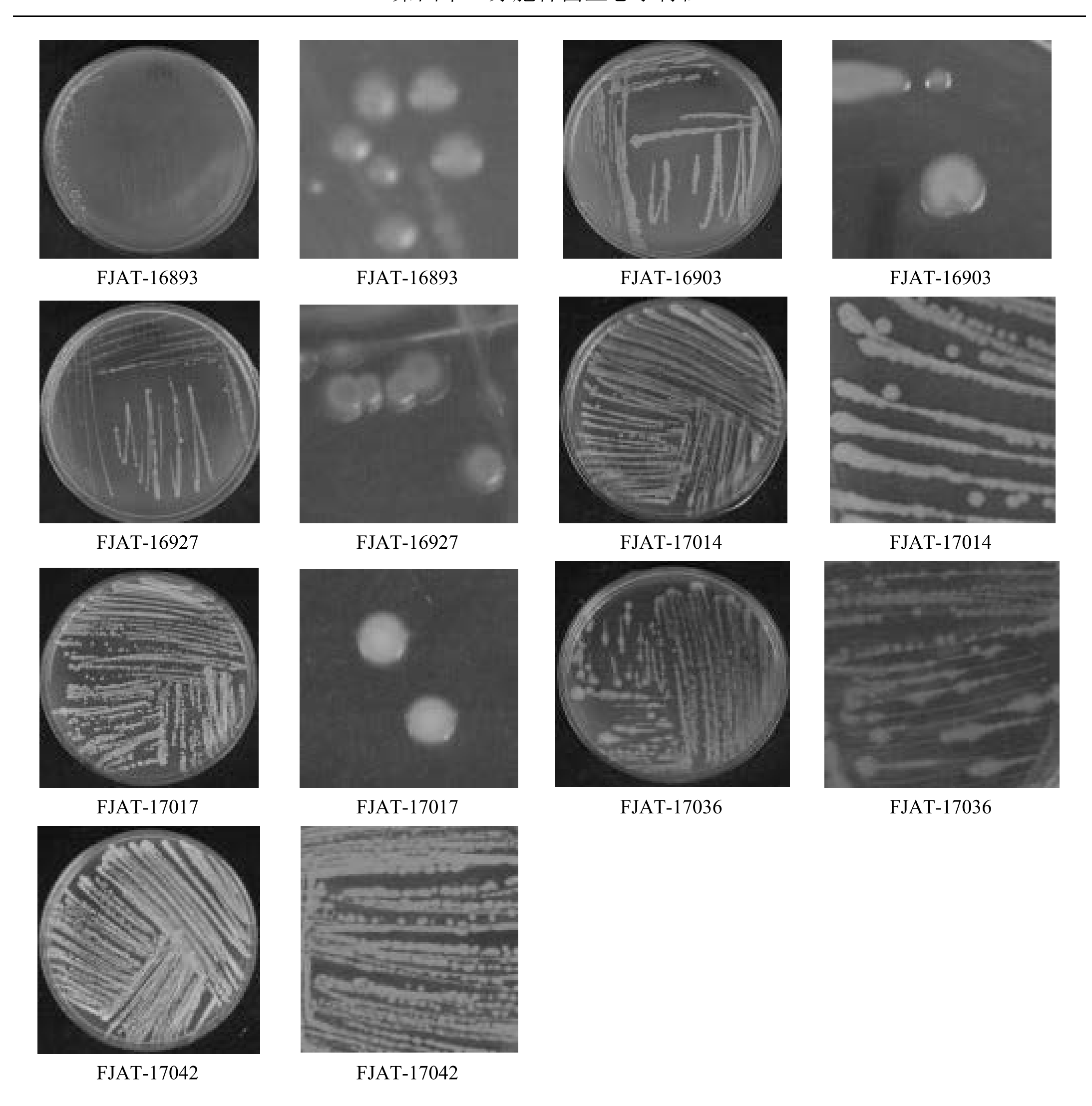


图 4-50　武夷山国家自然保护区 43 种芽胞杆菌代表菌株菌落图（另见彩图）

2. 菌落特征

武夷山国家自然保护区芽胞杆菌代表菌株的菌落特征描述见表 4-47。

表 4-47　武夷山国家自然保护区 43 种芽胞杆菌代表菌株菌落特征

菌株编号	菌落形态描述
FJAT-16048	小，光滑，乳白色，湿润，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16098	小，光滑，浅黄色，湿润，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16129	小，光滑，淡黄色，湿润，圆形，隆起，边缘不整齐，半透明
FJAT-16132	中，光滑，浅黄色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，半透明
FJAT-16134	大，褶皱，白色，干燥，圆形，隆起，边缘整齐，不透明

续表

菌株编号	菌落形态描述
FJAT-16135	很小，光滑，浅灰色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，半透明
FJAT-16140	中，光滑，黄色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，不透明
FJAT-16141	大，光滑，浅灰色，湿润，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16151	小，光滑，乳白色中部偏深，湿润，圆形，微隆，边缘锯齿状，半透明
FJAT-16156	中，光滑，浅黄色，干燥，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16162	小，光滑，橘红色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16164	大，粗糙，乳白色，干燥，不规则，扁平，边缘羽毛状，不透明
FJAT-16167	中，光滑，乳白色，湿润，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16178	大，粗糙，乳白色，湿润，圆形，扁平，边缘锯齿状，不透明
FJAT-16201	大，粗糙，白色，干燥，近圆形，扁平，边缘不整齐，不透明
FJAT-16209	大，粗糙，浅黄色，干燥，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16248	中，光滑，淡黄色，干燥，圆形，中部隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16266	小，光滑，淡粉色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，半透明
FJAT-16291	小，光滑，淡黄色，湿润，形状不规则，隆起，边缘整齐，半透明
FJAT-16301	中，光滑，淡黄色，干燥，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16339	小，光滑，淡粉色，湿润，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-16340	中，光滑，浅灰色，湿润，不规则，微隆，边缘羽毛状，半透明
FJAT-16350	小，光滑，淡黄色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，不透明
FJAT-16354	小，光滑，淡黄色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，半透明
FJAT-16469	小，光滑，乳白色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16497	很小，光滑，淡黄色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16506	中，光滑，黄色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16532	小，光滑，黄色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16578	小，褶皱，乳白色，干燥，圆形，四周隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16703	小，光滑，浅黄色，湿润，圆形，隆起，边缘锯齿状，半透明
FJAT-16705	小，光滑，浅黄色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，半透明
FJAT-16872	小，光滑，黄色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，不透明
FJAT-16879	小，光滑，黄色中部白色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16883	小，光滑，浅黄色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16884	中，光滑，白色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，不透明
FJAT-16889	大，光滑，乳白色，干燥，圆形，中部微隆，边缘整齐，不透明
FJAT-16893	小，光滑，乳白色，湿润，圆形，隆起，边缘整齐，半透明
FJAT-16903	小，光滑，乳白色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，边缘透明
FJAT-16927	小，光滑，乳白色中部偏深，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，边缘透明
FJAT-17014	小，光滑，橙黄色，干燥，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-17017	小，光滑，乳白色，湿润，圆形，微隆，边缘整齐，不透明

续表

菌株编号	菌落形态描述
FJAT-17036	中，光滑，乳白色中部白色，湿润，圆形，扁平，边缘整齐，不透明
FJAT-17042	小，褶皱，白色，干燥，圆形，隆起，边缘整齐，不透明

四、芽胞杆菌种类分子鉴定

1. 16S rDNA 提取

从武夷山国家自然保护区土样中分离出的 434 株芽胞杆菌的 DNA，利用细菌 16S rDNA 通用引物 9F 和 1542R 进行 PCR 扩增，扩增电泳图谱见图 4-51，各菌株均获得一条 1500bp 左右的特异性条带。将扩增产物送至上海博尚生物技术有限公司测序。

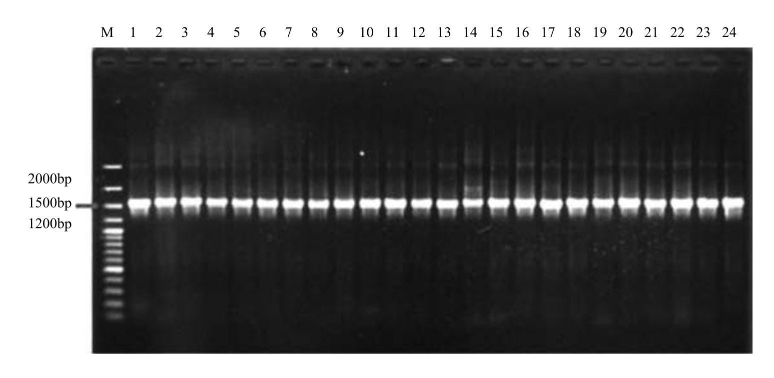


图 4-51　24 株芽胞杆菌 16S rDNA 基因扩增结果的电泳图谱

2. 芽胞杆菌鉴定

将测得的 16S rDNA 序列通过 NCBI 网站进行比对，结果表明 434 株分离株归属于 43 个种（表 4-48）。

表 4-48　芽胞杆菌 16S rDNA 鉴定结果

菌株编号	种类学名	中文名称	16S rDNA GenBank 登录号	相似性/%
FJAT-16164	*B. anthracis*	炭疽芽胞杆菌	KF278148	99.85
FJAT-16209	*B. aryabhattai*	阿氏芽胞杆菌	KF278157	100.0
FJAT-16883	*B. bataviensis*	巴达维亚芽胞杆菌	KF278197	100.0
FJAT-16354	*B. cecembensis*	科研中心芽胞杆菌	KF278179	95.95
FJAT-16889	*B. cereus*	蜡状芽胞杆菌	KF278199	100.0
FJAT-16469	*B. endoradicis*	根内芽胞杆菌	KF278181	99.12
FJAT-16705	*B. halmapalus*	盐敏芽胞杆菌	KF278193	98.52
FJAT-16532	*B. isronensis*	印空研芽胞杆菌	KF278187	100.0

续表

菌株编号	种类学名	中文名称	16S rDNA GenBank 登录号	相似性/%
FJAT-16048	*B. manliponensis*	万里浦芽胞杆菌	KF278123	98.46
FJAT-16291	*B. licheniformis*	地衣芽胞杆菌	KF278168	99.85
FJAT-16872	*B. marisflavi*	黄海芽胞杆菌	KF278195	100.0
FJAT-16134	*B. methylotrophicus*	甲基营养型芽胞杆菌	KF278130	99.86
FJAT-16162	*B. muralis*	壁芽胞杆菌	KF278147	99.85
FJAT-16884	*B. mycoides*	蕈状芽胞杆菌	KF278198	100.0
FJAT-17014	*B. nanhaiensis*	南海栖海洋菌	KF278203	100.0
FJAT-16339	*B. novalis*	休闲地芽胞杆菌	KF278175	99.83
FJAT-16201	*B. pseudomycoides*	假蕈状芽胞杆菌	KF278155	99.85
FJAT-16578	*B. safensis*	沙福芽胞杆菌	KF278189	100.0
FJAT-17017	*B. simplex*	简单芽胞杆菌	KF278204	100.0
FJAT-17042	*B. tequilensis*	特基拉芽胞杆菌	KF278206	99.89
FJAT-16178	*B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌	KF278153	100.0
FJAT-16301	*B. weihenstephanensis*	韦氏芽胞杆菌	KF278171	100.0
FJAT-16350	*B. agri*	土壤短芽胞杆菌	KF278177	99.38
FJAT-16156	*L. fusiformis*	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌	KF278145	100.0
FJAT-16167	*L. macroides*	延长赖氨酸芽胞杆菌	KF278149	99.57
FJAT-16506	*L. mangiferahumi*	芒果赖氨酸芽胞杆菌	KF278185	99.98
FJAT-16266	*L. massiliensis*	马赛赖氨酸芽胞杆菌	KF278163	97.51
FJAT-16248	*L. parviboronicapiens*	含低硼赖氨酸芽胞杆菌	KF278158	99.22
FJAT-16141	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌	KF278135	99.14
FJAT-16140	*L. xylanilyticus*	解木糖赖氨酸芽胞杆菌	KF278134	100.0
FJAT-16151	*P. alvei*	蜂房类芽胞杆菌	KF278140	98.82
FJAT-16703	*P. apiarius*	蜜蜂类芽胞杆菌	KF278192	98.88
FJAT-16893	*P. castaneae*	栗树类芽胞杆菌	KF278200	98.05
FJAT-16129	*P. elgii*	紫苏类芽胞杆菌	KF278128	99.40
FJAT-16135	*P. lautus*	灿烂类芽胞杆菌	KF278131	99.13
FJAT-16879	*P. pini*	松树类芽胞杆菌	KF278196	99.98
FJAT-16903	*P. taichungensis*	类芽胞杆菌台中种	KF278201	100.0
FJAT-16927	*P. terrigena*	土地类芽胞杆菌	KF278202	97.61
FJAT-16132	*P. insolitus*	奇特嗜冷芽胞杆菌	KF278129	98.70
FJAT-16497	*P. psychrodurans*	忍冷嗜冷芽胞杆菌	KF278183	99.82
FJAT-16098	*R. pycnus*	厚胞鲁梅尔芽胞杆菌	KF278125	98.39
FJAT-17036	*V. arenosi*	沙地绿芽胞杆菌	KF278205	100.0
FJAT-16340	*V. arvi*	田野绿芽胞杆菌	KF278176	100.0

五、芽胞杆菌系统发育

1. 系统发育图

从分离自武夷山国家自然保护区的 434 株分离株中选取 70 株及其对应参考菌株的 16S rDNA 序列，利用 ClustalX 软件进行序列比对，用 Mega4.0 软件构建系统进化树（图 4-52）。从图 4-52 中可以看出，武夷山国家自然保护区的芽胞杆菌主要聚为八大类。鉴定为 *B. mycoides*、*B. weihenstephanensis*、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*B. cereus* 和 *B. pseudomycoides* 的菌株聚在一起，均为蜡状芽胞杆菌组的菌株，鉴定为 *B. manliponensis* 的菌株处于蜡状芽胞杆菌组的边缘，可见这些种的 16S rDNA 序列在系统发育上差异较小。

图 4-52　基于 16S rDNA 的武夷山芽胞杆菌系统发育

2. 系统发育分组

鉴定为 *Bacillus marisflavi*、*B. licheniformis*、*B. tequilensis* 和 *B. methylotrophicus* 的菌株聚为一类。鉴定为 *B. halmapalus*、*B. nanhaiensis* 和 *B. aryabhattai* 的菌株聚为一类。鉴定为 *B. safensis* 的菌株单独成为一类。*Lysinibacillus macroides*、*L. xylanilyticus*、*L. massiliensis*、*L. mangiferahumi*、*L. parviboronicapiens*、*L. sphaericus* 和 *L. fusiformis* 聚在一起，均为 *Lysinibacillus* 属，鉴定为 *B. isronensis* 和 *B. cecembensis* 的菌株处在 *Lysinibacillus* 属的边缘；鉴定为 *Viridibacillus arenosi*、*V. arvi*、*Rummeliibacillus pycnus*、*Psychrobacillus psychrodurans* 和 *P. insolitus* 的菌株聚在一起，这两个类群构成了一个较大的类群。鉴定为 *B. bataviensis*、*B. novalis*、*B. endoradicis*、*B. simplex* 和 *B. muralis* 的菌株聚为一类。鉴定为 *Brevibacillus agri* 的菌株单独成为一类。鉴定为 *Paenibacillus elgii*、*P. pini*、*P. lautus*、*P. taichungensis*、*P. castaneae*、*P. terrigena*、*P. apiarius* 和 *P. alvei* 的菌株聚为一类，均为 *Paenibacillus* 属的菌株。

六、芽胞杆菌样方分布多样性

基于 16S rDNA 的鉴定结果对武夷山国家自然保护区各土壤样本的芽胞杆菌种类进行统计，结果见表 4-50。从表 4-49 可知，武夷山国家自然保护区各土壤样本中芽胞杆菌种类的数量为 1～7 种。对武夷山国家自然保护区不同地区土壤样本的芽胞杆菌种类数量进行单因素分析，结果显示不同地区土壤样本的芽胞杆菌种类数量差异极显著（P=0.000）。

表 4-49　武夷山国家自然保护区不同土壤样本芽胞杆菌种类数量

地点	土样编号	土样来源	种类数	芽胞杆菌种类学名	比例/%
黄岗山顶	FJAT-5619	SJ-1 黄岗山顶土壤	3	*B. cereus*、*B. mycoides*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5622	SJ-5 黄岗山顶土壤	4	*B. anthracis*、*B. cereus*、*B. mycoides*、*L. xylanilyticus*	9.30
	FJAT-5733	SJ-12 黄岗山边土	4	*B. mycoides*、*L. mangiferihumi*、*B. cecembensis*、*V. arenosi*	9.30
	FJAT-5735	SJ-8 黄岗山松树根际土	2	*B. cereus*、*L. xylanilyticus*	4.65
	FJAT-5738	SJ-13 黄岗山苔藓土	4	*B. mycoides*、*B. cereus*、*B. simplex*、*V. arenosi*	9.30
	FJAT-5744	黄岗山顶杂草地土壤	4	*B. cereus*、*B. mycoides*、*P. psychrodurans*、*B. anthracis*	9.30
	FJAT-5745	黄岗山顶水塘边土壤 1#	6	*B. methylotrophicus*、*L. xylanilyticus*、*B. mycoides*, *B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. simplex*	13.95
	FJAT-5754	黄岗山顶岩石下土壤	5	*B. mycoides*、*V. arvi*、*B. endoradicis*、*L. xylanilyticus*、*B. licheniformis*	11.63
	FJAT-5755	黄岗山顶树下土壤	4	*B. mycoides*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus*、*V. arvi*	9.30
	FJAT-5756	黄岗山顶矮松下土壤	3	*B. mycoides*、*V. arenosi*、*B. cereus*	6.98
	FJAT-5762	黄岗山顶福建界碑下土壤 1#	4	*B. mycoides*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus*、*B. anthracis*	9.30
	FJAT-5763	黄岗山顶江山界碑下土壤	2	*B. thuringiensis*、*B. mycoides*	4.65
	FJAT-5765	黄岗山顶武夷山天下第一峰牌下土壤 1#	5	*B. mycoides*、*B. simplex*、*B. thuringiensis*、*P. psychrodurans*、*L. xylanilyticus*	11.63

续表

地点	土样编号	土样来源	种类数	芽胞杆菌种类学名	比例/%
黄岗山顶	FJAT-5766	黄岗山顶土壤 ③	3	*B. mycoides*、*B. endoradicis*、*B. anthracis*	6.98
	FJAT-5768	黄岗山山最顶土壤 ⑤	3	*B. mycoides*、*L. macroides*、*L. mangiferihumi*	6.98
	FJAT-5818	SJ-2 黄岗山草地土壤	4	*B. mycoides*、*L. xylanilyticus*、*B. cereus*、*B. simplex*	9.30
	FJAT-5819	SJ-3 黄岗山草地土壤	7	*B. mycoides*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*B. novalis*、*V. arvi*、*V. arenosi*、*B. cereus*	16.28
	FJAT-5820	SJ-7 黄岗山烂草根土壤	3	*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. mycoides*	6.98
	FJAT-5821	SJ-9 黄岗山石头旁边土	5	*B. mycoides*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus*、*B. agri*、*B. anthracis*	11.63
	FJAT-5825	黄岗山顶草坪土壤 ⑩	5	*B. isronensis*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus*、*B. mycoides*、*B. anthracis*	11.63
黄岗山中部	FJAT-5626	SJ-18 黄岗山中部土壤 ②	1	*B. mycoides*	2.33
	FJAT-5627	SJ-22 树下土	2	*B. mycoides*、*B. thuringiensis*	4.65
	FJAT-5654	SJ-59 树下土	2	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*	4.65
	FJAT-5668	SJ-19 苔藓地衣土壤	1	*B. cereus*	2.33
	FJAT-5750	黄岗山屋前草丛土壤	2	*B. cereus*、*B. anthracis*	4.65
	FJAT-5751	黄岗山窗户下地衣土壤	2	*B. cereus*、*B. mycoides*	4.65
	FJAT-5759	黄岗山发射塔下土壤 2#	3	*B. mycoides*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5764	黄岗山牌下土壤	3	*B. cereus*、*B. safensis*、*B. mycoides*	6.98
	FJAT-5726	黄岗山水泥厂地土壤 1#	3	*B. mycoides*、*L. xylanilyticus*、*B. weihenstephanensis*	6.98
	FJAT-5748	黄岗山墙角土壤 3#	2	*B. thuringiensis*、*P. psychrodurans*	4.65
	FJAT-5761	黄岗山草丛边沙地土壤 1#	4	*B. mycoides*、*B. endoradicis*、*B. cereus*、*V. arvi*	9.30
	FJAT-5826	黄岗山发射塔下土壤 1#	5	*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*B. mycoides*、*L. xylanilyticus*、*B. cereus*	11.63
	FJAT-5828	黄岗山水塘边土壤②	3	*B. anthracis*、*L. xylanilyticus*、*B. mycoides*	6.98
黄岗山脚	FJAT-5628	SJ-24 黄岗山土壤 3	4	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*L. parviboronicapiens*、*L. xylanilyticus*	9.30
	FJAT-5629	SJ-27 黄岗山土壤 3	5	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. pseudomycoides*、*L. parviboronicapiens*、*L. xylanilyticus*	11.63
	FJAT-5630	SJ-28 黄岗山土壤 3	5	*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. xylanilyticus*、*P. alvei*	11.63
	FJAT-5631	SJ-29 黄岗山土壤	4	*B. anthracis*、*L. fusiformis*、*B. thuringiensis*、*B. mycoides*	9.30
	FJAT-5632	SJ-30 黄岗山土壤 3	6	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. mycoides*、*L. xylanilyticus*、*L. fusiformis*、*B. cereus*	13.95
	FJAT-5633	SJ-31 水中沙土	2	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*	4.65
	FJAT-5634	SJ-32 黄岗山土壤 3	4	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*L. massiliensis*	9.30
桐木关	FJAT-5635	SJ-41 桐木关柳杉表面土 4	4	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*V. arenosi*、*L. xylanilyticus*	9.30
	FJAT-5636	SJ-42 桐木关银杏烂树叶土	5	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. muralis*、*L. xylanilyticus*、*L. sphaericus*	11.63

续表

地点	土样编号	土样来源	种类数	芽胞杆菌种类学名	比例/%
桐木关	FJAT-5640	SJ-49 桐木关红豆杉洞内土壤 4	5	*B. thuringiensis*、*P. insolitus*、*L. xylanilyticus*、*B. methylotrophicus*、*P. lautus*	11.63
	FJAT-5699	桐峰茶丁志中红茶基地茶园土 1	5	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*L. parviboronicapiens*、*B. muralis*	11.63
	FJAT-5700	桐峰茶丁志枯木下土壤	4	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*L. fusiformis*、*B. cereus*	9.30
	FJAT-5701	桐峰茶丁志棕榈树下土壤	2	*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*	4.65
	FJAT-5702	桐峰茶丁志南方红豆杉树皮 2	3	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*L. parviboronicapiens*	6.98
	FJAT-5703	桐峰茶丁志大松树下土壤 1	4	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. pseudomycoides*、*L. xylanilyticus*	9.30
	FJAT-5704	桐峰茶场溪边土壤	3	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*	6.98
	FJAT-5708	桐木关城墙下土壤 2	4	*B. anthracis*、*B. mycoides*、*L. macroides*、*L. xylanilyticu*	9.30
	FJAT-5709	桐木关城门边土壤 1	3	*B. thuringiensis*、*B. muralis*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5710	瀑布下土样 1#	3	*B. anthracis*、*B. mycoides*、*P. taichungensis*	6.98
挂墩	FJAT-5786	中挂敦黄花菜边土	4	*B. anthracis*、*L. xylanilyticus*、*B. safensis*、*B. cereus*	9.30
	FJAT-5787	挂敦路口斜坡上土	6	*B. aryabhattai*、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus*、*P. elgii*	13.95
	FJAT-5788	挂敦路口朝阳坡上土	3	*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. pseudomycoides*	6.98
	FJAT-5789	挂敦路口土壤②	5	*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*B. mycoides*、*R. pycnus*、*B. pseudomycoides*	11.63
	FJAT-5790	中挂敦路边石头边土	5	*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*B. pseudomycoides*、*B. anthracis*、*B. cereus*	11.63
	FJAT-5791	挂敦路口土壤 ③	7	*L. xylanilyticus*、*B. aryabhattai*、*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. safensis*、*B. manliponensis*	16.28
	FJAT-5794	中挂敦 河边土	3	*V. arenosi*、*L. xylanilyticus*、*B. anthracis*	6.98
	FJAT-5795	挂敦路口土壤 ④	5	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*V. arenosi*、*B. pseudomycoides*	11.63
	FJAT-5796	中挂敦 石头下土	4	*B. thuringiensis*、*B. cereus*、*B. anthracis*、*L. xylanilyticus*	9.30
	FJAT-5798	挂敦路口土壤 ⑥	2	*L. xylanilyticus*、*B. thuringiensis*	4.65
	FJAT-5802	挂敦路口土壤 ⑤	2	*L. xylanilyticus*、*B. thuringiensis*	4.65
	FJAT-5804	挂敦路口⑦ 石头上土	4	*B. anthracis*、*P. apiarius*、*B. pseudomycoides*、*B. halmapalus*	9.30
	FJAT-5805	挂墩路口茶树根际土	2	*B. thuringiensis*、*P. alvei*	4.65
	FJAT-5806	挂墩路口阴面土	4	*L. xylanilyticus*、*B. manliponensis*、*B. pseudomycoides*、*L. sphaericus*	9.30
大竹岚	FJAT-5568	大竹岚半山腰岩壁土 1#	3	*B. anthracis*、*L. sphaericus*、*B. thuringiensis*	6.98
	FJAT-5576	大竹岚半山腰松树根系土 2#⑤	3	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*L. sphaericus*	6.98
	FJAT-5577	大竹岚半山腰润兰科根系土 1#	3	*B. anthracis*、*B. thuringiensis*、*V. arenosi*	6.98

续表

地点	土样编号	土样来源	种类数	芽胞杆菌种类学名	比例/%
大竹岚	FJAT-5581	大竹岚半山腰树下蘑菇根系土	3	*B. anthracis*、*B. mycoides*、*P. taichungensis*	6.98
	FJAT-5583	大竹岚半山腰沉积土 1#	3	*P. terrigena*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5585	大竹岚蕨类根系土 1#	3	*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5589	大竹岚岩石下土壤	2	*B. anthracis*、*L. xylanilyticus*	4.65
	FJAT-5590	大竹岚瞭楼苔藓土壤	4	*B. nanhaiensis*、*B. muralis*、*B. aryabhattai*、*B. simplex*	9.30
	FJAT-5591	大竹岚瞭望台边土 1#	3	*B. thuringiensis*、*B. marisflavi*、*B. cereus*	6.98
	FJAT-5594	大竹岚米珍树下土 3#	3	*B. thuringiensis*、*P. pini*、*L. sphaericus*	6.98
	FJAT-5595	大竹岚木兰属根系土	1	*B. thuringiensis*	2.33
	FJAT-5597	大竹岚茶树根系土 1	3	*B. thuringiensis*、*B. bataviensis*、*B. mycoides*	6.98
	FJAT-5601	大竹岚土壤 17	2	*B. thuringiensis*、*V. arenosi*	4.65
	FJAT-5605	大竹岚竹子根系土 3#	4	*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*B. cereus*	9.30
	FJAT-5609	大竹岚侧柏土样 14	2	*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*	4.65
	FJAT-5610	大竹岚牛藤土样	3	*B. anthracis*、*B. tequilensis*、*B. thuringiensis*	6.98
	FJAT-5612	大竹岚枫香根系土 1#	5	*B. cereus*、*B. pseudomycoides*、*P. castaneae*、*B. muralis*、*B. thuringiensis*	11.63
	FJAT-5613	大竹岚银杏树下土 1#	3	*B. thuringiensis*、*B. aryabhattai*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5615	大竹岚车前草边土	3	*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*	6.98
	FJAT-5616	大竹岚腐质土 1#	2	*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*	4.65

七、芽胞杆菌地点分布多样性

对武夷山国家自然保护区 4 个地点的芽胞杆菌种类数量进行统计，结果见表 4-50，从表中可以看出，黄岗山地点分离到的芽胞杆菌种类最多（26 种），各个地点分离到的芽胞杆菌种类也有所差别。

表 4-50　武夷山国家自然保护区芽胞杆菌种类统计

地点	种类数	芽胞杆菌种类学名	比例/%
黄岗山	26	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cecembensis*、*B. cereus*、*B. endoradicis*、*B. isronensis*、*B. licheniformis*、*B. methylotrophicus*、*B. mycoides*、*B. novalis*、*B. pseudomycoides*、*B. safensis*、*B. simplex*、*B. thuringiensis*、*B. weihenstephanensis*、*B. agri*、*L. fusiformis*、*L. macroides*、*L. mangiferahumi*、*L. massiliensis*、*L. parviboronicapiens*、*L. xylanilyticus*、*P. alvei*、*P. psychrodurans*、*V. arenosi*、*V. arvi*	60.47
桐木关	17	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*、*B. methylotrophicus*、*B. muralis*、*B. mycoides*、*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*L. fusiformis*、*L. macroides*、*L. parviboronicapiens*、*L. sphaericus*、*L. xylanilyticus*、*P. lautus*、*P. taichungensis*、*P. insolitus*、*V. arenosi*	39.53

续表

地点	种类数	芽孢杆菌种类学名	比例/%
挂墩	17	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*、*B. halmapalus*、*B. manliponensis*、*B. mycoides*、*B. pseudomycoides*、*B. safensis*、*B. thuringiensis*、*L. mangiferahumi*、*L. sphaericus*、*L. xylanilyticus*、*P. alvei*、*P. apiarius*、*P. elgii*、*R. pycnus*、*V. arenosi*	39.53
大竹岚	19	*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. bataviensis*、*B. cereus*、*B. marisflavi*、*B. muralis*、*B. mycoides*、*B. nanhaiensis*、*B. pseudomycoides*、*B. simplex*、*B. tequilensis*、*B. thuringiensis*、*L. sphaericus*、*L. xylanilyticus*、*P. castaneae*、*P. pini*、*P. taichungensis*、*P. terrigena*、*V. arenosi*	44.19

从表 4-51 可以看出，*B. mycoides*、*B. cereus*、*L. xylanilyticus* 为黄岗山芽孢杆菌的优势种，*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*L. xylanilyticus* 为桐木关芽孢杆菌的优势种，*L. xylanilyticus*、*B. thuringiensis*、*R. pycnus*、*B. anthracis* 为挂墩芽孢杆菌的优势种，*B. thuringiensis* 为大竹岚芽孢杆菌的优势种，*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus* 为武夷山国家自然保护区芽孢杆菌的优势种。*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*、*B. mycoides*、*B. pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*V. arenosi* 在武夷山国家自然保护区 4 个采样地区的土壤样本中均有分离到，*B. cecembensis*、*B. endoradicis*、*B. isronensis*、*B. licheniformis*、*B. novalis*、*B. weihenstephanensis*、*B. agri*、*L. massiliensis*、*P. psychrodurans*、*V. arvi* 只在黄岗山地区的土壤样本中分离到，*P. lautus* 和 *P. insolitus* 只在桐木关地区的土壤样本中分离到，*B. halmapalus*、*B. manliponensis*、*P. apiarius*、*P. elgii*、*R. pycnus* 只在挂墩地区的土壤样本中分离到，*B. bataviensis*、*B. marisflavi*、*B. nanhaiensis*、*B. tequilensis*、*P. castaneae*、*P. pini*、*P. terrigena* 只在大竹岚地区的土壤样本中分离到。

表 4-51　武夷山国家自然保护区各地区芽孢杆菌的分离频度（%）

种类学名	黄岗山	桐木关	挂墩	大竹岚	总体
B. anthracis	37.50	75.00	57.14	35.00	45.35
B. aryabhattai	5.00	8.33	14.29	10.00	8.14
B. bataviensis	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
B. cecembensis	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
B. cereus	57.50	16.67	42.86	15.00	39.53
B. endoradicis	7.50	0.00	0.00	0.00	3.49
B. halmapalus	0.00	0.00	7.14	0.00	1.16
B. isronensis	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
B. manliponensis	0.00	0.00	14.29	0.00	2.33
B. licheniformis	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
B. marisflavi	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
B. methylotrophicus	2.50	8.33	0.00	0.00	2.33
B. muralis	0.00	25.00	0.00	10.00	5.81
B. mycoides	75.00	16.67	7.14	10.00	40.70

续表

种类学名	黄岗山	桐木关	挂墩	大竹岚	总体
B. nanhaiensis	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
B. novalis	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
B. pseudomycoides	5.00	8.33	42.86	25.00	16.28
B. safensis	2.50	0.00	14.29	0.00	3.49
B. simplex	10.00	0.00	0.00	5.00	5.81
B. tequilensis	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
B. thuringiensis	40.00	83.33	71.43	85.00	61.63
B. weihenstephanensis	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
B. agri	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
L. fusiformis	5.00	8.33	0.00	0.00	3.49
L. macroides	2.50	8.33	0.00	0.00	2.33
L. mangiferahumi	5.00	0.00	7.14	0.00	3.49
L. massiliensis	2.50	0.00	0.00	0.00	1.16
L. parviboronicapiens	5.00	16.67	0.00	0.00	4.65
L. sphaericus	0.00	8.33	7.14	15.00	5.81
L. xylanilyticus	50.00	58.33	78.57	30.00	51.16
P. alvei	2.50	0.00	7.14	0.00	2.33
P. apiarius	0.00	0.00	7.14	0.00	1.16
P. castaneae	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
P. elgii	0.00	0.00	7.14	0.00	1.16
P. lautus	0.00	8.33	0.00	0.00	1.16
P. pini	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
P. taichungensis	0.00	8.33	0.00	5.00	2.33
P. terrigena	0.00	0.00	0.00	5.00	1.16
P. insolitus	0.00	8.33	0.00	0.00	1.16
P. psychrodurans	7.50	0.00	0.00	0.00	3.49
R. pycnus	0.00	0.00	64.29	0.00	10.47
V. arenosi	10.00	8.33	14.29	10.00	10.47
V. arvi	10.00	0.00	0.00	0.00	4.65

表 4-52 显示了武夷山国家自然保护区 4 个地区每种芽胞杆菌的平均样本含量，可以看出，黄岗山平均样本总芽胞杆菌含量最少，只有 5.896×10^{4}CFU/g，挂墩的平均样本总芽胞杆菌含量最多，达 41.157×10^{4}CFU/g。*B. mycoides* 和 *B. thuringiensis* 是黄岗山平均样本含量最多的两种芽胞杆菌；*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*V. arenosi* 是桐木关平均样本含量最多的 5 种芽胞杆菌；*P. alvei*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*B. pseudomycoides*、*B. anthracis* 是挂墩平均样本含量最多的 5 种芽胞杆菌；

B. tequilensis、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*B. mycoides*、*L. xylanilyticus* 是大竹岚平均样本含量最多的 5 种芽胞杆菌。

表 4-52　武夷山国家自然保护区各地区芽胞杆菌平均含量　（单位：$\times 10^4$ CFU/g）

种类学名	黄岗山	桐木关	挂墩	大竹岚
B. anthracis	0.374	3.463	1.386	3.457
B. aryabhattai	0.023	2.417	0.043	0.619
B. bataviensis	0.000	0.000	0.000	0.429
B. cecembensis	0.004	0.000	0.000	0.000
B. cereus	0.669	0.292	0.639	0.395
B. endoradicis	0.014	0.000	0.000	0.000
B. halmapalus	0.000	0.000	0.011	0.000
B. isronensis	0.001	0.000	0.000	0.000
B. manliponensis	0.000	0.000	0.071	0.000
B. licheniformis	0.013	0.000	0.000	0.000
B. marisflavi	0.000	0.000	0.000	0.105
B. methylotrophicus	0.001	0.008	0.000	0.000
B. muralis	0.000	0.667	0.000	0.767
B. mycoides	2.258	0.471	0.036	1.238
B. nanhaiensis	0.000	0.000	0.000	0.095
B. novalis	0.033	0.000	0.000	0.000
B. pseudomycoides	0.038	0.417	2.439	0.090
B. safensis	0.001	0.000	0.357	0.000
B. simplex	0.089	0.000	0.000	0.048
B. tequilensis	0.000	0.000	0.000	16.190
B. thuringiensis	1.471	10.996	3.243	13.471
B. weihenstephanensis	0.006	0.000	0.000	0.000
B. agri	0.094	0.000	0.000	0.000
L. fusiformis	0.054	0.583	0.000	0.000
L. macroides	0.006	0.083	0.000	0.000
L. mangiferahumi	0.076	0.000	0.036	0.000
L. massiliensis	0.025	0.000	0.000	0.000
L. parviboronicapiens	0.225	0.646	0.000	0.000
L. sphaericus	0.000	0.125	0.036	0.867
L. xylanilyticus	0.300	3.675	3.221	1.081
P. alvei	0.005	0.000	28.571	0.000
P. apiarius	0.000	0.000	0.314	0.000

续表

种类学名	黄岗山	桐木关	挂墩	大竹岚
P. castaneae	0.000	0.000	0.000	0.043
P. elgii	0.000	0.000	0.004	0.000
P. lautus	0.000	0.046	0.000	0.000
P. pini	0.000	0.000	0.000	0.571
P. taichungensis	0.000	0.063	0.000	0.476
P. terrigena	0.000	0.000	0.000	0.005
P. insolitus	0.000	0.308	0.000	0.000
P. psychrodurans	0.054	0.000	0.000	0.000
R. pycnus	0.000	0.000	0.643	0.000
V. arenosi	0.056	1.333	0.107	0.310
V. arvi	0.006	0.000	0.000	0.000
总和	5.896	25.593	41.157	40.257

八、芽胞杆菌海拔分布多样性

表 4-53 列出了武夷山国家自然保护区芽胞杆菌随海拔分布多样性计算结果。黄岗山顶的丰富度最高，达 10.394，桐木关的芽胞杆菌种类多样性最高，达 1.881。

表 4-53　武夷山国家自然保护区各地区芽胞杆菌种类多样性

采集地点（海拔）	丰富度（D_{MA}）	均匀度（J'）	多样性（H'）	优势度（D_J）
黄岗山顶（2158m）	10.394	0.526	1.520	0.582
黄岗山中部（1700m）	7.692	0.581	1.393	0.700
挂墩（1200m）	4.304	0.423	1.198	0.500
黄岗山脚（1100m）	3.998	0.656	1.573	0.664
大竹岚（1000m）	4.871	0.568	1.674	0.716
桐木关（890m）	4.935	0.664	1.881	0.762

根据多样性指数和采集地点海拔作图，见图 4-53～图 4-56 所示，芽胞杆菌的丰富度随海拔降低而呈现下降趋势；均匀度和优势度随海拔降低呈现上升趋势；多样性随海拔的降低呈现先下降后升高的趋势。经 PASW Statistics 18.0 软件分析，武夷山国家自然保护区芽胞杆菌的物种数在各海拔采样地间差异达极显著水平，多样性（H'）差异达显著水平。

表 4-54 中列出了分布与海拔显著相关的芽胞杆菌种类，*B. cecembensis*、*B. isronensis*、*B. licheniformis*、*B. mycoides*、*B. novalis*、*B. thuringiensis*、*B. agri* 和 *P. psychrodurans* 的分布与海拔显著相关，*B. endoradicis* 和 *V. arvi* 的分布与海拔极显著相关，其中，除 *B.*

thuringiensis 的分布与海拔呈现出负相关外，其余种类都是正相关。

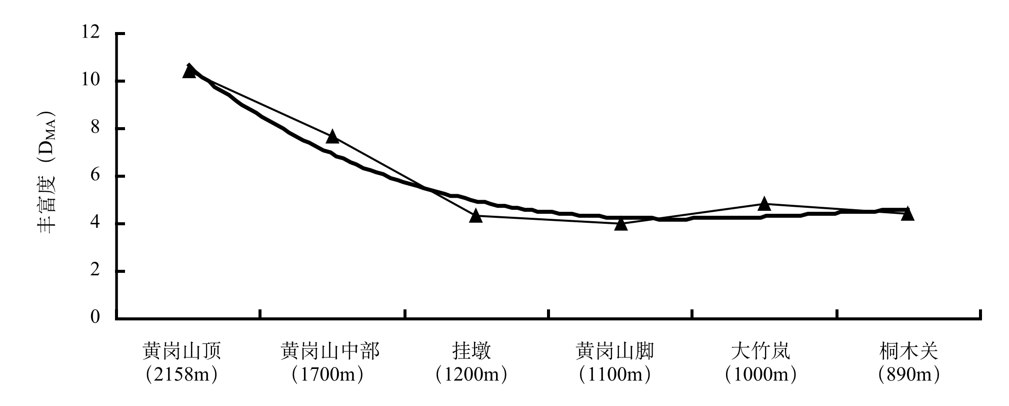


图 4-53　武夷山国家自然保护区芽胞杆菌丰富度（D_{MA}）随海拔变化趋势图

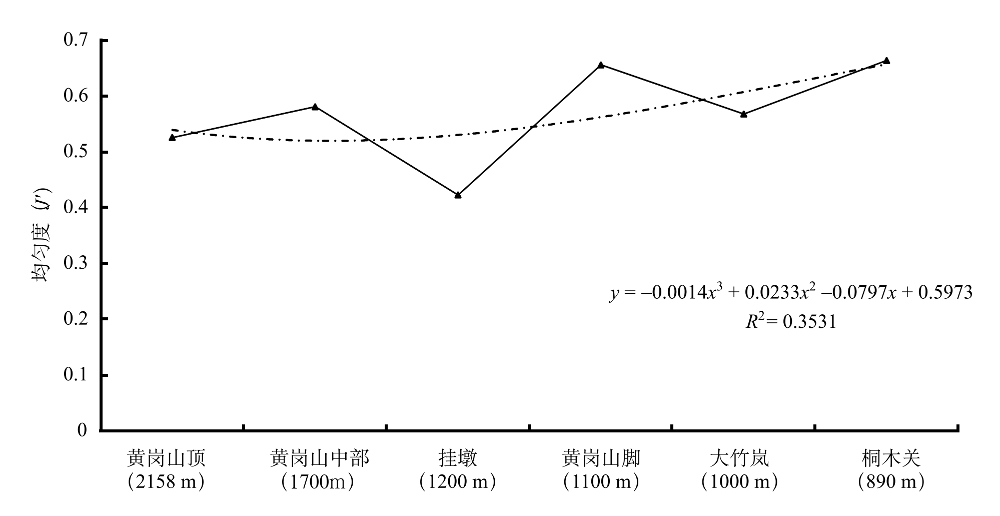


图 4-54　武夷山国家自然保护区芽胞杆菌均匀度（J'）随海拔变化趋势图

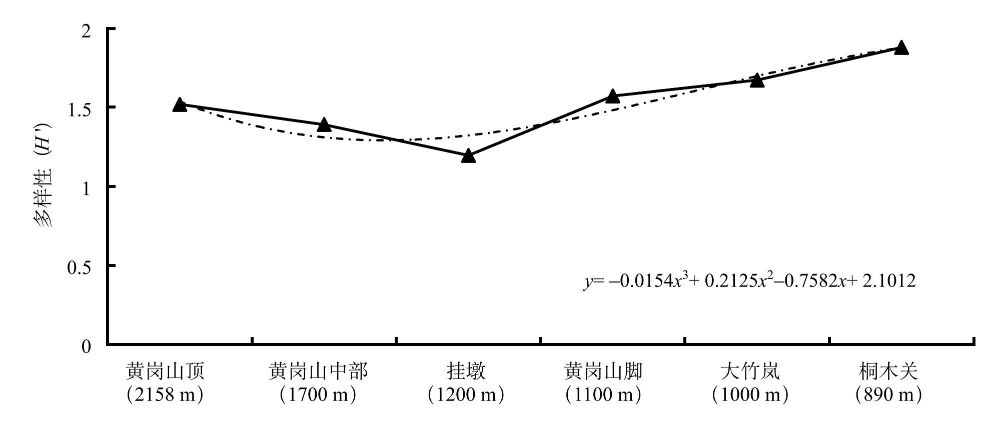


图 4-55　武夷山国家自然保护区芽胞杆菌多样性（H'）随海拔变化趋势图

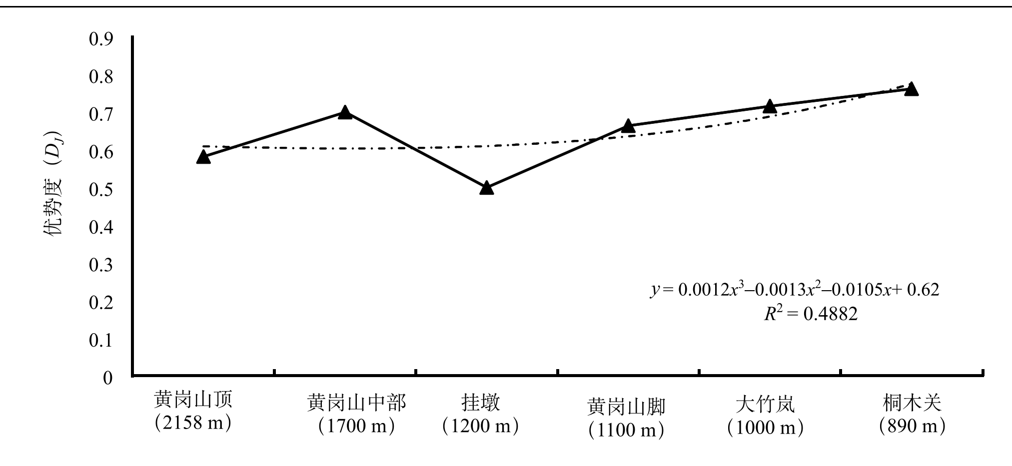


图 4-56　武夷山国家自然保护区芽胞杆菌优势度（D_J）随海拔变化趋势图

表 4-54　武夷山国家自然保护区芽胞杆菌种类分布与海拔相关性

种类学名	相关性系数	种类学名	相关性系数
B. cecembensis	0.819*	*B. novalis*	0.819*
B. endoradicis	0.959**	*B. thuringiensis*	-0.838*
B. isronensis	0.819*	*B. agri*	0.819*
B. licheniformis	0.819*	*P. psychrodurans*	0.857*
B. mycoides	0.843*	*V. arvi*	0.963**

*在 0.05 水平（双侧）上显著相关；**在 0.01 水平（双侧）上极显著相关

九、优势芽胞杆菌地理分化多样性

选取武夷山国家自然保护区的芽胞杆菌优势种，即 *B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus*，来调查武夷山国家自然保护区芽胞杆菌的地理分化。选取武夷山国家自然保护区 4 个地区鉴定为 *B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus* 的菌株 16S rDNA 序列，通过 ClustalX 软件对齐后，用软件 Mega4.0 构建进化树。由图 4-57 和图 4-58 可以看出，*B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus* 的地理分化均不明显，同一个地区分离到的菌株没有明显分别聚在一起。武夷山的 *B. thuringiensis* 大致聚为 6 类（图 4-57），*L. xylanilyticus* 大致聚为 7 类（图 4-58）。用 DNAMAN 6.0.3.99 软件对被试 *B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus* 菌株的 16S rDNA 序列和标准菌株的序列分别进行比较，结果见图 4-59 和图 4-60，图中阴影部分表示不同分离株与参考菌株序列在该位点的差异碱基。由图 4-59 可以看出，与参考菌株 *B. thuringiensis* ATCC 10792 比较，武夷山 *B. thuringiensis* 菌株的 16S rDNA 序列的变异主要在 175bp 位点发生 C/T 转换，类群Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ的菌株均有这样的变异，类群Ⅴ和Ⅵ与参考菌株相比没有发现变异。由图 4-60 可以看出，与参考菌株 *L. xylanilyticus* XDB9 的 16S rDNA 序列比较，武夷山 *L. xylanilyticus* 菌株的变异主要是在 78bp 位点发生 T/C 转换，此外，部分类别还有各自特有的差异。例如，类群Ⅱ的部分菌株在 71bp、106bp、109bp 分别发生 T/C、T/C、C/T 的转换；类群Ⅲ的 FJAT-16367 菌株 107bp 位点发生 T/C

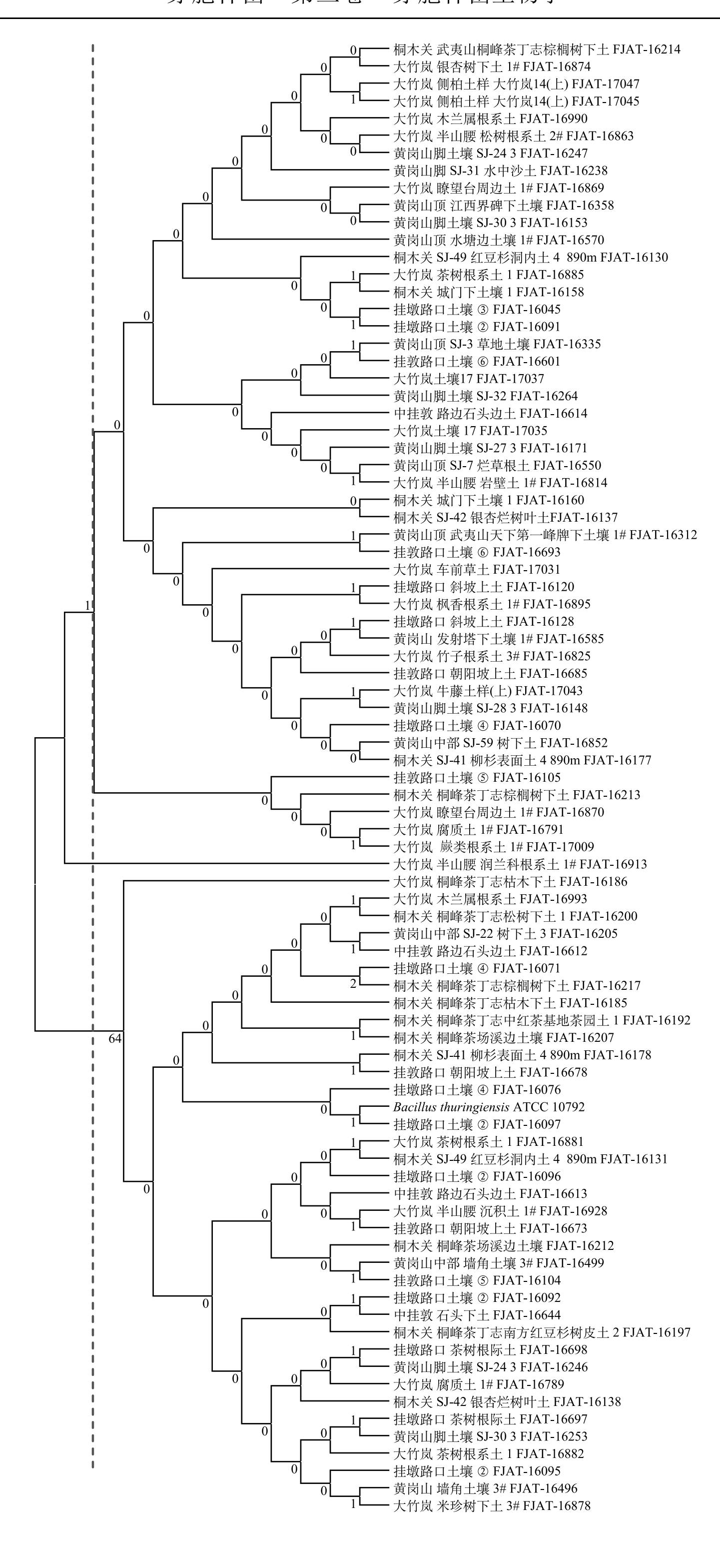


图 4-57　武夷山国家自然保护区 *B. thuringiensis* 基于 16S rDNA 的地理分化聚类图

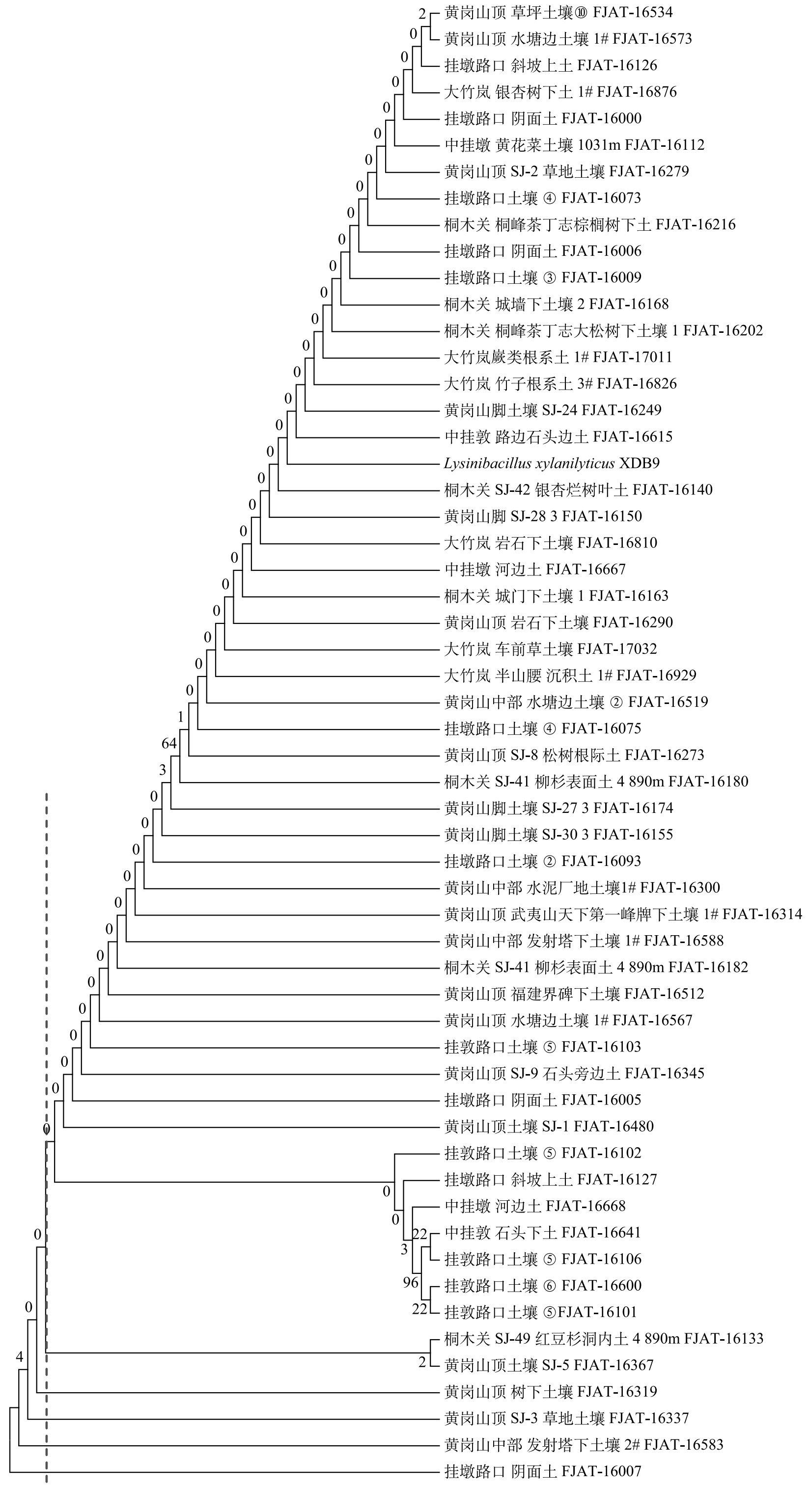


图 4-58　武夷山国家自然保护区 *L. xylanilytcus* 基于 16S rDNA 的地理分化聚类图

类群 I

Bacillus thuringiensis ATCC 10792	CTAATACCGGATAACATTTT	180
桐木关 武夷山桐峰茶丁志棕榈树下土 FJAT-16214	CTAATACCGGATAATATTTT	68
大竹岚 银杏树下土 1# FJAT-16874	CTAATACCGGATAATATTTT	116
大竹岚 侧柏土样 大竹岚14(上) FJAT-17047	CTAATACCGGATAATATTTT	106
大竹岚 侧柏土样 大竹岚14(上) FJAT-17045	CTAATACCGGATAATATTTT	102
大竹岚 木兰属根系土 FJAT-16990	CTAATACCGGATAATATTTT	102
大竹岚 半山腰 松树根系土 2# FJAT-16863	CTAATACCGGATAATATTTT	75
黄岗山脚土壤 SJ-24 3 FJAT-16247	CTAATACCGGATAATATTTT	109
黄岗山脚 SJ-31 水中沙土 FJAT-16238	CTAATACCGGATAATATTTT	94
大竹岚 瞭望台周边土 1# FJAT-16869	CTAATACCGGATAATATTTT	94
黄岗山顶 江西界碑下土壤 FJAT-16358	CTAATACCGGATAATATTTT	94
黄岗山脚土壤 SJ-30 3 FJAT-16153	CTAATACCGGATAATATTTT	117
黄岗山顶 水塘边土壤 1# FJAT-16570	CTAATACCGGATAATATTTT	113
桐木关 SJ-49 红豆杉洞内土 4 890m FJAT-16130	CTAATACCGGATAATATTTT	73
大竹岚 茶树根系土 1 FJAT-16885	CTAATACCGGATAATATTTT	94
桐木关 城门下土壤 1 FJAT-16158	CTAATACCGGATAATATTTT	95
挂墩路口土壤 ③ FJAT-16045	CTAATACCGGATAATATTTT	77
挂墩路口土壤 ② FJAT-16091	CTAATACCGGATAATATTTT	92
黄岗山顶 SJ-3 草地土壤 FJAT-16335	CTAATACCGGATAATATTTT	80
挂敦路口土壤 ⑥ FJAT-16601	CTAATACCGGATAATATTTT	109
大竹岚土壤17 FJAT-17037	CTAATACCGGATAATATTTT	90
黄岗山脚土壤 SJ-32 FJAT-16264	CTAATACCGGATAATATTTT	112
中挂敦 路边石头边土 FJAT-16614	CTAATACCGGATAATATTTT	111
大竹岚土壤 17 FJAT-17035	CTAATACCGGATAATATTTT	105
黄岗山脚土壤 SJ-27 3 FJAT-16171	CTAATACCGGATAATATTTT	96
黄岗山顶 SJ-7 烂草根土 FJAT-16550	CTAATACCGGATAATATTTT	115
大竹岚 半山腰 岩壁土 1# FJAT-16814	CTAATACCGGATAATATTTT	128
Consensus	ctaataccggataa atttt	

类群 II

Bacillus thuringiensis ATCC 10792	CTAATACCGGATAACATTTT	180
桐木关 城门下土壤 1 FJAT-16160	CTAATACCGGATAATATTTT	96
桐木关 SJ-42 银杏烂树叶土FJAT-16137	CTAATACCGGATAATATTTT	116
黄岗山顶 武夷山天下第一峰牌下土壤 1# FJAT-16312	CTAATACCGGATAATATTTT	96
挂敦路口土壤 ⑥ FJAT-16693	CTAATACCGGATAATATTTT	130
大竹岚 车前草土 FJAT-17031	CTAATACCGGATAATATTTT	102
挂墩路口 斜坡上土 FJAT-16120	CTAATACCGGATAATATTTT	126

大竹岚 枫香根系土 1# FJAT-16895	CTAATACCGGATAATATTTT	127
挂墩路口 斜坡上土 FJAT-16128	CTAATACCGGATAATATTTT	96
黄岗山 发射塔下土壤 1# FJAT-16585	CTAATACCGGATAATATTTT	111
大竹岚 竹子根系土 3# FJAT-16825	CTAATACCGGATAATATTTT	131
挂敦路口 朝阳坡上土 FJAT-16685	CTAATACCGGATAATATTTT	94
大竹岚 牛藤土样(上) FJAT-17043	CTAATACCGGATAATATTTT	102
黄岗山脚土壤 SJ-28 3 FJAT-16148	CTAATACCGGATAATATTTT	114
挂墩路口土壤 ④ FJAT-16070	CTAATACCGGATAATATTTT	130
黄岗山中部 SJ-59 树下土 FJAT-16852	CTAATACCGGATAATATTTT	96
桐木关 SJ-41 柳杉表面土 4 890m FJAT-16177	CTAATACCGGATAATATTTT	72
Consensus	ctaataccggataa atttt	

类群III

Bacillus thuringiensis ATCC 10792	CTAATACCGGATAACATTTT	180
桐木关 桐峰茶丁志棕榈树下土 FJAT-16213	CTAATACCGGATAATATTTT	92
挂敦路口土壤 ⑤ FJAT-16105	CTAATACCGGATAATATTTT	93
大竹岚 腐质土 1# FJAT-16791	CTAATACCGGATAATATTTT	93
大竹岚 蕨类根系土 1# FJAT-17009	CTAATACCGGATAATATTTT	102
大竹岚 瞭望台周边土 1# FJAT-16870	CTAATACCGGATAATATTTT	117
Consensus	ctaataccggataa atttt	

类群IV、V

Bacillus thuringiensis ATCC 10792	CTAATACCGGATAACATTTT	180
大竹岚 半山腰 润兰科根系土 1# FJAT-16913	CTAATACCGGATAACATTTT	95
大竹岚 桐峰茶丁志枯木下土 FJAT-16186	CTAATACCGGATAACATTTT	95
Consensus	ctaataccggataa atttt	

图 4-59　武夷山国家自然保护区 *B. thuringiensis* 16S rDNA 序列的变异

类群 I

Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	GAATAATCTATTTTACTTCA	84
黄岗山顶 草坪土壤⑩ FJAT-16534	GAATAATCTATTTTACTTCA	123
黄岗山顶 水塘边土壤 1# FJAT-16573	GAATAATCTATTTTACTTCA	113
挂墩路口 斜坡上土 FJAT-16126	GAATAATCTATTTTACTTCA	103
大竹岚 银杏树下土 1# FJAT-16876	GAATAATCTATTTTACTTCA	128
挂墩路口 阴面土 FJAT-16000	GAATAATCTATTTTACTTCA	81
中挂墩 黄花菜土壤 1031m FJAT-16112	GAATAATCTATTTTACTTCA	103
黄岗山顶 SJ-2 草地土壤 FJAT-16279	GAATAATCTATTTTACTTCA	131
挂墩路口土壤 ④ FJAT-16073	GAATAATCTATTTTACTTCA	130

桐木关 桐峰茶丁志棕榈树下土 FJAT-16216	GAATAATCTATTTTACTTCA	101
挂墩路口 阴面土 FJAT-16006	GAATAATCTATTTTACTTCA	79
挂墩路口土壤 ③ FJAT-16009	GAATAATCTATTTTACTTCA	116
桐木关 城墙下土壤 2 FJAT-16168	GAATAATCTATTTTACTTCA	117
桐木关 桐峰茶丁志大松树下土壤 1 FJAT-16202	GAATAATCTATTTTACTTCA	102
大竹岚 蕨类根系土 1# FJAT-17011	GAATAATCTATTTTACTTCA	107
大竹岚 竹子根系土 3# FJAT-16826	GAATAATCTATTTTACTTCA	138
黄岗山脚土壤 SJ-24 FJAT-16249	GAATAATCTATTTTACTTCA	116
中挂敦 路边石头边土 FJAT-16615	GAATAATCTATTTTACTTCA	119
桐木关 SJ-42 银杏烂树叶土 FJAT-16140	GAATAATCTATTTTACTTCA	127
黄岗山脚 SJ-28 3 FJAT-16150	GAATAATCTATTTTACTTCA	103
大竹岚 岩石下土壤 FJAT-16810	GAATAATCTATTTTACTTCA	140
中挂墩 河边土 FJAT-16667	GAATAATCTATTTTACTTCA	101
桐木关 城门下土壤 1 FJAT-16163	GAATAATCTATTTTACTTCA	116
黄岗山顶 岩石下土壤 FJAT-16290	GAATAATCTATTTTACTTCA	128
大竹岚 车前草土壤 FJAT-17032	GAATAATCTATTTTACTTCA	111
大竹岚 半山腰 沉积土 1# FJAT-16929	GAATAATCTATTTTACTTCA	101
黄岗山中部 水塘边土壤 ② FJAT-16519	GAATAATCTATTTTACTTCA	117
挂墩路口土壤 ④ FJAT-16075	GAATAATCTATTTTACTTCA	124
黄岗山顶 SJ-8 松树根际土 FJAT-16273	GAATAATCTATTTTACTTCA	132
桐木关 SJ-41 柳杉表面土 4 890m FJAT-16180	GAATAATCTATTTTACTTCA	125
黄岗山脚土壤 SJ-27 3 FJAT-16174	GAATAATCTATTTCACTTCA	116
黄岗山脚土壤 SJ-30 3 FJAT-16155	GAATAATCTATTTCACTTCA	117
挂墩路口土壤 ② FJAT-16093	GAATAATCTATTTCACTTCA	116
黄岗山中部 水泥厂地土壤 1# FJAT-16300	GAATAATCTATTTCACTTCA	137
黄岗山顶 武夷山天下第一峰牌下土壤 1# FJAT-16314	GAATAATCTATTTCACTTCA	136
黄岗山中部 发射塔下土壤 1# FJAT-16588	GAATAATCTATTTCACTTCA	111
桐木关 SJ-41 柳杉表面土 4 890m FJAT-16182	GAATAATCTATTTCACTTCA	116
黄岗山顶 福建界碑下土壤 FJAT-16512	GAATAATCTATTTCACTTCA	125
黄岗山顶 水塘边土壤 1# FJAT-16567	GAATAATCTATTTCACTTCA	123
挂敦路口土壤 ⑤ FJAT-16103	GAATAATCTATTTCACTTCA	115
黄岗山顶 SJ-9 石头旁边土 FJAT-16345	GAATAATCTATTTCACTTCA	116
挂墩路口 阴面土 FJAT-16005	GAATAATCTATTTCACTTCA	39
黄岗山顶土壤 SJ-1 FJAT-16480	GAATAATCTATTTCACTTCA	123
Consensus	gaataatctattt acttca	

Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	TCACCAAGGCGACGATGCGT	184
黄岗山顶草坪土壤⑩FJAT-16534	TCACCAAGGCAACGATGCGT	223

黄岗山顶水塘边土壤 1＃FJAT-16573	TCACCAAGGCGACGATGCGT	213
桂墩路口斜坡上土 1＃FJAT-16126	TCACCAAGGCGACGATGCGT	203
大竹岚银杏树下土 1＃FJAT-16876	TCACCAAGGCGACGATGCGT	228
桂墩路口阴面土 FJAT-16000	TCACCAAGGCGACGATGCGT	181
中桂墩黄花菜土壤 1031m FJAT-16112	TCACCAAGGCGACGATGCGT	203
黄岗山顶 SJ-2 草地土壤 FJAT-16279	TCACCAAGGCGACGATGCGT	231
桂墩路口土壤④FJAT-16073	TCACCAAGGCGACGATGCGT	230
桐木关桐峰茶丁志棕榈树下土 FJAT-16202	TCACCAAGGCGACGATGCGT	201
桂墩路口阴面土 FJAT-16006	TCACCAAGGCGACGATGCGT	179
桂墩路口土壤③FJAT-16009	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
桐木关城墙下土壤 2 FJAT-16168	TCACCAAGGCGACGATGCGT	217
桐木关桐峰茶丁志大松树下土壤 1 FJAT-16202	TCACCAAGGCGACGATGCGT	202
大竹岚蕨类根系土 1＃FJAT-17011	TCACCAAGGCGACGATGCGT	207
大竹岚竹子根系土 3＃FJAT-16826	TCACCAAGGCGACGATGCGT	238
黄冈山脚土壤 SJ-24 FJAT-16249	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
中桂墩路边石头边土 FJAT-16615	TCACCAAGGCGACGATGCGT	219
桐木关 SJ-42 银杏烂树叶土 FJAT-16140	TCACCAAGGCGACGATGCGT	227
黄冈山脚 SJ-28 3FJAT-16150	TCACCAAGGCGACGATGCGT	203
大竹岚岩石下土壤 FJAT-16810	TCACCAAGGCGACGATGCGT	240
中桂墩河边土 FJAT-16667	TCACCAAGGCGACGATGCGT	201
桐木关城门下土壤 1 FJAT-16163	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
黄岗山顶岩石下土壤 FJAT-16290	TCACCAAGGCGACGATGCGT	228
大竹岚车前草土壤 FJAT-17032	TCACCAAGGCGACGATGCGT	211
大竹岚半山腰沉积土 1＃FJAT-16929	TCACCAAGGCGACGATGCGT	201
黄岗山中部水塘边土壤②FJAT-16519	TCACCAAGGCGACGATGCGT	217
桂墩路口土壤④FJAT-16075	TCACCAAGGCGACGATGCGT	224
黄岗山顶 SJ-8 松树根际土 FJAT-16273	TCACCAAGGCGACGATGCGT	232
桐木关 SJ-41 柳杉表面土 4890m FJAT-16180	TCACCAAGGCGACGATGCGT	225
黄冈山脚土壤 SJ-27 3 FJAT-16174	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
黄冈山脚土壤 SJ-30 3 FJAT-16155	TCACCAAGGCGACGATGCGT	217
桂墩路口土壤④FJAT-16093	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
黄岗山中部水泥厂地土壤 1＃FJAT-16300	TCACCAAGGCGACGATGCGT	237
黄岗山顶武夷山天下第一峰碑下土壤 1＃FJAT-16314	TCACCAAGGCGACGATGCGT	236
武夷山中部发射塔下土壤 1＃FJAT-16588	TCACCAAGGCGACGATGCGT	211
桐木关 SJ-41 柳杉表面土 4890mFJAT-16182	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
黄岗山顶福建界碑下土壤 FJAT-16512	TCACCAAGGCGACGATGCGT	225
黄岗山顶水塘边土壤 1＃FJAT-16567	TCACCAAGGCGACGATGCGT	223
桂墩路口土壤⑤FJAT-16103	TCACCAAGGCGACGATGCGT	215
黄岗山顶 SJ-9 石头旁边土 FJAT-16345	TCACCAAGGCGACGATGCGT	216
桂墩路口阴面土 FJAT-16005	TCACCAAGGCGACGATGCGT	139
黄岗山顶土壤 SJ-1 FJAT-16480	TCACCAAGGCGACGATGCGT	223
Consensus	tcaccaaggcg acgatgcgt	

类群Ⅱ

Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	TCT ATTTT ACTT CATGGT GA	90
桂墩路口土壤⑤FJAT-16102	TCT ATTTC ACTT CATGGT GA	121
桂墩路口斜坡上土 FJAT-16127	TCT ATTTC ACTT CATGGT GA	140
中桂墩河边土 FJAT-16668	TCT ATTTC ACTT CATGGT GA	124
中桂墩石头下土 FJAT-16641	CCT ATTTC ACTT CATGGT GA	123
桂墩路口土壤⑤FJAT-16106	CCT ATTTC ACTT CATGGT GA	116
桂墩路口土壤⑥FJAT-16600	CCT ATTTC ACTT CATGGT GA	122
桂墩路口土壤⑤FJAT-16101	CCT ATTTC ACTT CATGGT GA	116
Consensus	ctattt actt catggt ga	
Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	AATACT GAAAGA CGGTTT CG	110
桂墩路口土壤⑤FJAT-16102	AATACT GAAAGA CGGTTT CG	141
桂墩路口斜坡上土 FJAT-16127	AATACT GAAAGA CGGTTT CG	160
中桂墩河边土 FJAT-16668	AATACT GAAAGA CGGTTT CG	144
中桂墩石头下土 FJAT-16641	AATACT GAAAGA CGGCTT TG	143
桂墩路口土壤⑤FJAT-16106	AATACT GAAAGA CGGCTT TG	136
桂墩路口土壤⑥FJAT-16600	AATACT GAAAGA CGGCTT TG	142
桂墩路口土壤⑤FJAT-16101	AATACT GAAAGA CGGCTT TG	136
Consensus	aatact gaaaga cgg tt g	

类群Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ

Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	TTAT AGTTT GGGAT AACT CC	44
桐木关 SJ-49 红豆杉洞内土 4890M FJAT-16133	TTAT AGTTT GGGAT AACT CC	87
黄岗山顶土壤 SJ-5 FJAT-16367	TTAT AGTTT GGGAT AACT CC	76
黄岗山顶树下土壤 FJAT-16319	TTAT AGTTT GGGAT AACT CC	77
黄岗山顶 SJ-3 草地土壤 FJAT-16337	TTAT AGTTT GGGAT AACT CC	76
黄岗山中部发射塔下土壤 2# FJAT-16583	TTAT AGTTT GGGAT AACT CC	72
桂墩路口阴面土 FJAT-16007	CTAT AGTTT GGGAT AACT CC	82
Consensus	tat agttt gggat aact cc	
Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	64
桐木关 SJ-49 红豆杉洞内土 4890M FJAT-16133	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	107
黄岗山顶土壤 SJ-5 FJAT-16367	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	96
黄岗山顶树下土壤 FJAT-16319	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	97
黄岗山顶 SJ-3 草地土壤 FJAT-16337	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	96
黄岗山中部发射塔下土壤 2# FJAT-16583	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	92
桂墩路口阴面土 FJAT-16007	GGGAAA CCGGGGCT AATACC	102
Consensus	gggaaa ccggggct aatacc	
Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	GAATAAT CTATTT TACTTCA	84

桐木关 SJ-49 红豆杉洞内土 4890M FJAT-16133	GAATAAT CTATTT CACTTCA	127
黄岗山顶土壤 SJ-5 FJAT-16367	GAATAAT CTATTT CACTTCA	116
黄岗山顶树下土壤 FJAT-16319	GAATAAT CTATTT CACTTCA	117
黄岗山顶 SJ-3 草地土壤 FJAT-16337	GAATAAT CTATTT CACTTCA	116
黄岗山中部发射塔下土壤 2# FJAT-16583	GAATAAT CTATTT CACTTCA	112
桂墩路口阴面土 FJAT-16007	GAATAAT CTATTT CTCCTCA	122
Consensus	gaataat ctattt c tca	

Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	104
桐木关 SJ-49 红豆杉洞内土 4890M FJAT-16133	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	147
黄岗山顶土壤 SJ-5 FJAT-16367	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	136
黄岗山顶树下土壤 FJAT-16319	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	137
黄岗山顶 SJ-3 草地土壤 FJAT-16337	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	136
黄岗山中部发射塔下土壤 2# FJAT-16583	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	132
桂墩路口阴面土 FJAT-16007	TGGT GAAAT ACT GAAAGACG	142
Consensus	tggt gaaat act gaaagacg	

Lysinibacillus xylanilyticus XDB9	GTTT CGGCT GT CGCTAT AAG	124
桐木关 SJ-49 红豆杉洞内土 4890M FJAT-16133	GTTT CGGCT GT CGCTAT AAG	167
黄岗山顶土壤 SJ-5 FJAT-16367	GTCT CGGCT GT CGCTAT AAG	156
黄岗山顶树下土壤 FJAT-16319	GTTT CGGCT GT CGCTAT AAG	157
黄岗山顶 SJ-3 草地土壤 FJAT-16337	GTTT CGGCT GT CGCTAT AAG	156
黄岗山中部发射塔下土壤 2# FJAT-16583	GTTT CGGCT GT CGCTAT AAG	152
桂墩路口阴面土 FJAT-16007	GTTT CGGCT GT CGCTAT AGG	162
Consensus	gt tcggct gt cgctata g	

图 4-60　武夷山国家自然保护区 *L. xylanilyticus* 16S rDNA 序列的变异

转换；类群Ⅶ在 25bp、79bp、81bp、123bp 分别发生 T/C 转换、A/T 颠换、T/C 转换、A/G 转换。

十、讨论

本研究从采集自武夷山国家自然保护区的土壤样品中分离、鉴定芽胞杆菌，根据芽胞杆菌的种类、数量及菌株脂肪酸成分讨论其多样性，分别根据 16S rDNA 的鉴定结果和菌株脂肪酸成分分析芽胞杆菌的地理分化，现将主要研究结果讨论如下。

武夷山国家自然保护区芽胞杆菌种类概况。从武夷山国家自然保护区黄岗山、桐木关、挂墩、大竹岚 4 个地区采集的 86 份土样中分离、保存芽胞杆菌 434 株，通过 16S rDNA 序列比对将其鉴定为 43 个种。黄岗山地区分离到的芽胞杆菌种类数最多，但是芽胞杆菌平均样本含量最少，只有 5.896×10^4CFU/g；挂墩地区分离到的芽胞杆菌种类数虽然不多，但是芽胞杆菌平均样本含量最多，达 41.157×10^4CFU/g。4 个采样地分离到的芽胞杆菌种类、含量都有所不同，各地区都有特有的芽胞杆菌种类。4 个采样地的优势芽胞杆菌种类也有所差异，但 *B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus* 在 4 个地区的大部分土样中普遍存在，分离频度的计算也显示它们是武夷山国家自然保护区的芽胞杆菌优势种。

武夷山国家自然保护区芽胞杆菌种类多样性。基于 16S rDNA 鉴定结果的多样性指数计算结果显示：武夷山国家自然保护区芽胞杆菌的丰富度随海拔降低而呈现下降趋势，均匀度和优势度随海拔降低呈现上升趋势，多样性随海拔的降低呈现先下降后升高的趋势。部分芽胞杆菌种类的分布也与海拔有关，*B. cecembensis*、*B. isronensis*、*B. licheniformis*、*B. mycoides*、*B. novalis*、*B. thuringiensis*、*B. agri* 和 *P. psychrodurans* 的分布与海拔显著相关，*B. endoradicis* 和 *V. arvi* 的分布与海拔极显著相关，其中，除 *B. thuringiensis* 的分布与海拔呈现出负相关外，其余种类都是正相关。

武夷山国家自然保护区芽胞杆菌地理分化。研究从 16S rDNA 序列和菌株脂肪酸成分两个角度讨论了武夷山国家自然保护区芽胞杆菌的优势种 *B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus* 的地理分化。两个角度的分析均显示 *B. thuringiensis* 和 *L. xylanilyticus* 的地理分化不明显。但是从武夷山国家自然保护区分离到的菌株与参考菌株（*B. thuringiensis* ATCC 10792 和 *L. xylanilyticus* XDB9）相比，在 16S rDNA 碱基序列上均有不同程度的变异。*B. thuringiensis* 的变异主要体现在 175bp 位点发生 C/T 的转换；*L. xylanilyticus* 的变异主要体现在 78bp 位点发生 T/C 转换。

第五章　植物内生芽胞杆菌种群多样性

第一节　植物内生菌研究

一、概述

植物内生菌是植物微生态系统中的重要组成部分，在长期的协同进化中，与植物形成了互惠互利的关系。植物内生菌能够产生多种全新的活性物质，作为生物防治资源、外源基因的载体和新药的来源，在农业、医药卫生领域有着巨大的应用潜力。2006 年，我国学者报道利用内生菌技术孕育出优质高产水稻，这进一步强调内生菌是一类非常重要的资源。1986 年，我国两位科学家在世界上宣布首次发现百合内生菌，自此内生菌技术的运用拉开帷幕。内生菌种植水稻的技术是由原中国科学院院武汉分院植物所的老科学家张政铨和聂开印在内生菌发现基础上，研发出的水稻浸种技术。内生菌是一种在百合细胞中与百合细胞共生的细菌，这一发现曾轰动了世界。根据常识，细菌是不能进入细胞的，尤其是不能进入单子叶的粮食作物，如水稻和小麦等。有科学家曾预言，如果细菌可以进入单子叶植物细胞，便有可能利用生物基因工程技术通过改良品种提高粮食产量和品质。经过近 20 年的潜心研究，张政铨和聂开印发现植物内生菌对粮食生产确实具有重大意义，但这种意义并不是体现在生物基因工程方面，而是体现在内生菌所独具的与细胞共生互利的生物特性上，内生菌的分泌物具有特殊的益生功效。由同济医大、电力总院等提供的检测显示，内生菌的分泌物具有明显的增强免疫和抗疲劳效果，并具有很高的医用价值。进一步的研究揭示，将内生菌的分泌物用于拌种，粮食作物的种子能丰富地表达内生菌的分泌物；这种种子发育生长后，在植物的根茎叶和果实中也可以极丰富地表达内生菌的分泌物。特别值得注意的是经过内生菌分泌物处理过的水稻种出的稻米也具备了提高人体免疫和抗疲劳的功效。虽然人们对内生菌的研究经过几十年，但是目前仍处于起步阶段，人们对于内生菌知之甚少，对内生菌的开发和应用才刚刚展开。本章就近年来有关内生菌的发现、定义、生物多样性、动力学规律、研究方法及应用方面进行概括，为内生菌深入研究提供理论参考。

二、内生菌的发现和定义

植物体内普遍存在着内生菌，但是由于其生活在没有外在感染症状的健康植物组织内部，因此其存在和作用长期以来被人们忽视。直到 20 世纪 30 年代，人们发现造成畜牧业重大损失的是由于牲畜取食了感染内生菌的牧草，这才开始对内生进行深入研究。内生菌一词 “endophyte” 最早是由德国科学家 DeBarry（1886）提出。Carrol（1986）将内生菌定义为生活在地上部分、活的植物组织内不引起明显症状的微生物。Petrini（1991）提出内生菌是指在生活史的一定阶段生活在活体植物组织内不引起植物明显病

害的微生物。Kleopper 等（1992）认为植物内生菌是指能够定殖在植物细胞间隙或细胞内，并与寄主植物建立和谐联合关系的一类微生物，并首次提出“植物内生细菌”的概念，他认为能在植物体内定殖的致病菌和菌根菌不属于内生菌。

目前，植物内生菌较被公认的定义是指那些在其生活史的一定阶段或者全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌或者细菌，被感染的宿主植物（至少是暂时）不表现出外在症状，是一个生态学概念，而非分类学单位。

三、内生菌研究现状

1. 内生菌的生物多样性

内生菌的生物多样性主要包括寄主植物种类多样性、内生菌在寄主植物不同部位分布多样性和内生菌自身种类多样性。研究发现内生菌具有普遍存在性，地球上 300 000 种植物中都有内生菌的存在（Strobel *et al.*，2004）。农业上研究较多的植物有水稻、小麦、棉花、高粱、牧草、马铃薯、玉米、甘蔗、甜菜、黄瓜、柠檬等（姜怡等，2005）。研究发现内生菌几乎存在于植物的所有组织中，不仅存在于植物的根、茎、叶、花、果、胚、种子中，在植物的根瘤中也可以分离到内生菌。

内生菌的种类也十分繁多，主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌三大类。目前有报道在各种农作物及经济作物中发现的内生细菌已超过 129 种，分属于 54 个属，主要为假单胞菌属（*Pseudomonas*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）、土壤杆菌属（*Agrobacterium*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、泛菌属（*Pantoea*）、甲基杆菌属（*Methylobacterium*）等。内生真菌主要在药用植物、羊茅属植物、热带树木中研究较多，现在发现的内生真菌主要为子囊菌类（Ascomycet）及其无形性，包括核菌纲（Pyrenomycetes）、盘菌纲（Discomyetes）和腔菌纲（Loculoascomyetes）等。内生放线菌主要在红树林、热带多年生树木及一些药用作物中研究较多，主要为链霉菌属（*Streptomyces*）、链轮丝菌属（*Streptoverticillum*）、游动放线菌属（*Actinoplanes*）、诺卡氏菌属（*Nocardia*）、小单胞菌属（*Micromonospora*）。表 5-1～表 5-3 分别列举了近 10 年研究过的内生细菌、内生真菌和内生放线菌及其寄主。

2. 植物内生菌动力学研究

植物内生菌的动力学主要是指内生菌在植物体内的定殖、分布和运动。内生菌一旦进入植物体内就寻找适于自己生存的组织定殖下来，而不是在各组织间到处扩散。Posada 和 Vega（2005）认为内生细菌主要定殖在细胞间隙。刘忠梅等（2005）用链霉素和利福平抗性标记菌株 B946 发现，菌株 B946 向茎基部和叶内转移。植物内生菌可以定殖于植物的根毛、叶片、维管组织、木质部的表皮细胞、细胞间隙、细胞质等。内生菌可以很容易地穿过植物皮层进入木质部导管中，随着植物的生长可以将内生菌运送到植物上部营养器官或繁殖器官中。而有些内生菌定殖在植物种子内，成为“种生内生菌”，它们成为下一代植物新植株内生菌的重要来源。

表 5-1　常见植物内生细菌种类及其在宿主中的存在部位

寄主植物	存在部位	内生细菌
水稻（Mano *et al.*，2006；Elvira and Vuurde，2000；Tripa *et al.*，2006）	种子	*Acidovorax* sp.
		Bacillus pumilus
		Bacillus subtilis
		Methylobacterium aquaticum
		Micrococcus luteus
		Paenibacillus amylolyticus
		Pantoea ananatis
		Sphingomonas melonis
		Sphingomonas yabuuchiaw
		Xanthomonas translucens
	茎秆	*Agrobacterium vitis*
		Azorhizobium caulinodans
		Azospirillum sp.
		Bacillus megatherium
		Bacillus subtilis
		Pseudomonas cepacia
	根、茎、叶	*Klebsiella* sp.
		Azoarcus sp.
		Serratia marcescens
		Methylobacternum sp.
		Herbaspirillum seropedicae
	种子	*Paenibacillus* sp.
		Acidovorax Pantoea
		Stenotrophomonas sp.
		Rhizobium sp.
		Bacillus sp.
		Curtobacterium sp.
		Methylobacterium sp.
		Sphingomonas sp.
		Xanthomonas sp.
		Micrococcus sp.
		Ochrobactrum oryzae
		Ochrobactrum gallinifaecis
香蕉（付业勤等，2007）	根、假茎、叶	*Bacillus* sp.
		Brevibacterium sp.
		Alcaligenes sp.
		Burkholderia sp.
魔芋（周盈等，2007）	茎	*Bacillus subtilis*
番木瓜（石晶盈等，2007）	果实	*Pseudomonas putida*
龙眼（朱育菁等，2008）	果实	*Enterobacter* sp.
		Pectobacterium sp.
		Kluyvera sp.
		Salmonella sp.
茄子（蓝江林等，2009）	茎	*Pseudomonas* sp.
		Erwinia sp.
玉米（罗明等，2004）	种子、根、叶、茎	*Bacillus* sp.
		Xanthomonas sp.
		Pseudomonas sp.
		Erwinia sp.
		Curtobacterium sp.
甜菜（Shi and Lou，2009）	叶、根	*Pseudomonas fluorescens*
		Bacillus flexus
		Pseudomonas fulva
		Bacillus pumilus
		Paenibacillus polymyxa
		Chryseobacterium indologenes
		Enterococcus faecalis
		Alternaria alternate
		Fusarium oxysporum
		Pythium aphanidermatum
		Penicillium expansum
		Plectosphaerella cucumerina
		Phoma betae
		Streptomyces griseofuscus
		Streptomyces globisporus
茜草（周涛等，2007）	根、茎	*Bacillus subtilis*
马铃薯（Garbeva *et al.*，2001）	茎、根	*Pseudomonas* sp.
		Agrobacterium radiobacter
		Stenotrophomonas maltophilia
		Flavobacterium resinovorans
		Stenotrophomonas maltophilia
		Bacillus sp.
		Sphingomonas paucimobilis

续表

寄主植物	存在部位	内生细菌
甘草（张敏等，2008）	茎、根、叶	*Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Pantoea* sp. *Serratia* sp.
烟草（易有金等，2007）	根、茎、叶	*Bacillus brevis*
药科植物和农作物（Chandrashekhara *et al.*，2007）	茎、根	*Bacillus* sp. *Pseudomonas fluorescens*
燃麻（张洪涛等，2007）	树枝	*Bacillus pumilus* *Curtobacterium flaccumfaciens* *Enterobacter cloacae* *Methylobacterium* sp. *Nocardia* sp. *Pantoea agglomerans* *Xanthomonas campestris*
马铃薯（Zareen and Sharon，2009）	块茎	*Enterobacter* sp. *Rahnella* sp. *Rhodanobacter* sp. *Pseudomonas* sp. *Stenotrophomonas* sp. *Xanthomonas* sp. *Phyllobacterium* sp.
马铃薯（Asis and Adach，2004）	块茎	*Enterobacter asburiae* *Pantoea agglomerans*
华重楼（陈小静等，2005）	块茎	*Derxia* sp. *Bacillus* sp. *Planococcus* sp. *Enterobacter* sp.
油菜（张志元等，2005）	种子	*Alternaria brassicae* *Alternaria brtassicola* *Selerotinia sclerotiorum*
玉米（Bressan and Broges，2004）	茎、根	*Pseudomonas syringae* *Xanthomonas* sp. *Bacillus* sp.
茄科作物（Hoang *et al.*，2008）	根、茎、叶	*Pseudomonas* sp. *Pantoea* sp. *Agrobacterium* sp. *Aeromonas* sp. *Agrobacterium tumefaciens*
黄瓜（田雪亮和单长卷，2006）	种子、苗	*Bacillus* sp. *Agrobacterium* sp. *Xanthomonas* sp. *Pseudomonas* sp. *Erwinia* sp. *Curtobacterium* sp.
甜菜（Rodrigo *et al.*，2007）	根、茎	*Burkholderia* sp. *Pantoea* sp. *Pseudomonas* sp. *Microbacterium* sp. *Burkholderia cepacia*
大豆（Lee *et al.*，2005）	根	*B. vallismortis* *B. atrophaeus* *B. mojavensis* *B. subtilis* *B. weihenstephanensis* *B. mycoides* *B. thuringiensis* *B. carboniphilus* *B. psychrosacharolyticus* *B. marinus*

内生菌在植株内的分布与寄主植物和部位有相关性。植株不同，其体内内生菌群落结构有差异。马冠华和肖崇刚（2004）分离了烟草、甜玉米、棉花和水稻 4 种植物根、茎、叶的内生细菌发现：烟草根、茎、叶中的内生细菌菌量变化趋势与甜玉米和棉花相同：根最多，茎次之，叶最少；而与水稻的根最多，叶次之，茎最少的规律不同。Rosenblueth

和 Martines（2004）研究发现内生菌在植株体内的分布通常为下部组织多于上部组织，越往植株顶部，内生菌越少。植株中内生菌群落结构组成不仅与植株类型、植物器官、

表 5-2　内生真菌及其寄主植物

寄主植物	内生真菌
银杏	*Chaetomium* sp.
（黄蓉等，2007）	
高羊茅	*Neotyphodium coenophialum*
（Pecetti *et al.*，2008）	
甘草	*Penicillium* sp.
（宋素琴等，2007）	*Fusarium* sp.
臂形草	*Acremonium* sp.
（郭志凯等，2007）	
	Acremonium
	Blastomyces
	Botryosphaeria sp.
	Cladosporium sp.
	Colletotrichum sp.
	Cordyceps sp.
	Diaporthe sp.
	Fusarium sp.
	Geotrichum sp.
	Gibberella sp.
	Gliocladium sp.
可可树	*Lasiodiplodia* sp.
（Marciano *et al.*，2005）	*Monilochoetes* sp.
	Nectria sp.
	Pestalotiopsis sp.
	Phomopsis sp.
	Pleurotus sp.
	Pseudofusarium sp.
	Rhizopycnis sp.
	Syncephalastrum sp.
	Trichoderma sp.
	Verticillium sp.
	Xylaria sp.
小连翘	*Cephalosporium* sp.
（袁保红等，2007）	*Rhizoctonia* sp.
蛇足石杉	*Alternaria* sp.
（龚玉霞等，2007）	*Cephalosporium* sp.
	Guignardia sp.
	Penicillium sp.
蛇足石杉	*Diaporthe* sp.
（龚玉霞等，2007）	*Trichoderma* sp.
	Phoma sp.
	Aspergillus sp.
	Fusarium sp.
	Verticillium sp.
	Phacodium sp.
	Paecilomyces sp.
	Colletotrichum sp.
云南美登木	*Mycelia sterilia*
（王海坤，2004）	*Chaetomium* sp.
	Ovulariopsis sp.
	Chrysosporium sp.
	Monilia sp.
龙血树和白木香	*Fusarium* sp.
（Li and Shun，2009）	*Mycelia sterilia* sp.
	Ovulariopsis sp.
	Penicillium sp.
	Cladosporium edgeworthrae
	Colletotrichum sp.
	Epicoccum sp.
	Fusarium oxysporum
	Pleospora sp.
	Rhinocladiella sp.
沙棘	*Alternaria* sp.
（李琦和孙广宇，2006）	*Penicillium* sp.
	Rhizopus sp.
	Cladosporium sp.
	Chaetomium sp.
	Aspergillus sp.
	Pestalotia sp.
	Basipetospom sp.
	Acremonium sp.
	Cephalosporium sp.

续表

寄主植物	内生真菌	寄主植物	内生真菌
白木香	*Acremonium* sp.	小花棘豆	*Embellisia* sp.
（张秀环等，2009）		（卢萍等，2009）	
滑桃树	*Fusarium* sp.	药用植物	*Rhizoctonia* sp.
（杜芝芝等，2008）		（戴传超等，2006）	*Sclerotium* sp.
芸香科	*Fusarium* sp.		*Pestalotiopsis* sp.
（Gond *et al.*，2007）	*Aspergillus* sp.		*Acremoniell* sp.
	Alternaria sp.		*Chaetomium* sp.
	Drechslera sp.		*Coniothyrium* sp.
	Rhizoctonia sp.		*Coryneum* sp.
	Curvularia sp.		*Alternaria* sp.
	Nigrospora sp.	麦冬	
	Stenella sp.	（陈宜涛等，2006）	*Fusarium* sp.
兰科植物	*Trichosporiella* sp.	柑橘（Larran *et al.*，2002）	*Colletotrichum* sp.
（伍建榕等，2006）	*Gliomastix murorum*		*Fusarium* sp.
	Catenularia piceae		*Alternaria* sp.
胡桃木	*Coniothyrium vitivora* Mitura		*Penicillium* sp.
（翟梅枝等，2008）			*Aspergillus* sp.
甘肃棘豆	*Embellisia* sp.	喜树	*Mycelia sterilia*
（余海涛等，2009）		（颜霞等，2008）	

表 5-3　植物内生放线菌及其寄主

寄主植物	内生放线菌	寄主植物	内生放线菌
红树林	*Micromonospora* sp.	红树林	*Streptomyces* sp.
（林鹏等，2005）	*Streptomyces* sp.	（雷湘兰，2006）	*Streptoverticillium* sp.
	Streptoverticillium sp.,		*Rhodoco* sp.
	Rhodococcus sp.	老鼠簕	*Micromonospora* sp.,
	Micropolyspora sp.,	（王蓉，2008）	*Verrucosispora* sp.
	Actinoplanes sp.		*Streptomyces* sp.
玉米	*Microbispora* sp.	小麦、大葱、油菜	*Micromonospora* sp.
（Dearaujo *et al.*，2000）	*Streptosporangium* sp.	（何宝花等，2008）	
木槿	*Micromonospora* sp.		
（张利敏和张利平，2009）	*Verrucosispora* sp.		

生长环境、生育期有关，还与品种有关。高增贵等（2004）研究发现内生细菌在不同玉米品种和不同生育期之间存在程度不同的差异，品种的遗传背景与其内生细菌的种类和数量显著相关。Conn 和 Franco（2004）发现土壤类型对小麦体内内生菌的种群结构组成起决定作用。植物内生菌具有一定的运动性，运动不仅有利于定殖作用，而且可以使内生菌及时躲开来自于外环境的生存压力等。蔡学清等（2003）研究了辣椒内生细菌 BS-1

和 BS-2 在辣椒、白菜体内的定殖动态，发现 BS-1 和 BS-2 在辣椒体内是通过维管束（木质部）进行传导的。Compant 等（2005）发现内生菌 *Burkholderia* 在葡萄（*Vitis vinifera*）地上部分是通过蒸腾系统进行系统性传播。安千里等（2001）在用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根时发现 SA2 主要从侧根皮层进入内皮层和维管束。

四、植物内生菌的研究方法

1. 植物内生菌检测

检测内生菌在植物体内的定殖动态变化最常规的方法是抗药性标记法，通过目标细菌的自发突变或诱变，筛选出抗高浓度抗生素的突变体，再以此标记株进行回收检测。常用的抗生素有利福平、链霉素等。蔡学清等（2003）利用双抗标记成功地检测到枯草芽胞杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态。吴蔼民等（2000）用抗利福平标记法，对来自棉花的内生菌 73a 在不同抗性棉花品种体内的定殖消长动态进行了研究。除了抗药性标记法外，还有免疫学方法，如酶联免疫吸附法（ELISA）、荧光抗体技术、Western 印迹法、基因标记法、特异性寡核苷酸片段标记法等也在内生菌的检测中广泛应用。Ramos 等（2002）运用 *gfp* 和 *gusA* 基因联合标记的方法研究了 *Azospirillum brasilense* 在小麦根部的定殖情况。近年来尤其是 GFP 的应用，使内生菌的检测更加快捷，由于宿主植物生活环境多样性及内生菌与宿主植物关系的复杂性，有关内生菌在植物体内定殖和分布的情况目前都是采用多种研究技术共同分析。

2. 植物内生菌多样性研究方法

传统植物内生菌的多样性研究多是采用先分离培养后通过形态学、生理生化特性、分子鉴定方法如 16S rRNA 序列分析对分离物进行鉴定得到其多样性信息。Hironobu 和 Hisao（2008）对从水稻各个组织中共分离到的 30 株细菌进行 SSU rRNA 序列分析，得到这 30 株内生细菌属于六大类（*B. pumilus*、*Curtobacterium* sp.、*Methylobacterium aquaticum*、*sphingomonas yabuuchiae*、*sphingomona melonis*、*Pantoea ananatis*）。但是由于 99%的微生物都是非可培养的，这种方法得到的信息不能够完全反映植物体本身，同时，分离培养工作量大，鉴定过程烦琐复杂，故急需一种快速、简单、能够更全面反映微生物群落结构的方法。

近年来，新兴的非培养法如变性梯度胶体电泳（DGGE）、末端限制性片段长度多样性（T-RFLP）等，大大弥补了传统培养方法的缺陷，为检测植物内生细菌种群多样性提供了更有效的手段。Janpen 等（2009）通过变性梯度凝胶电泳（DGGE）和传统的培养方法相结合分析了栽培稻中内生细菌的群落结构多样性。Sessitsch 等（2004）用 T-RFLP 和 DGGE 技术相结合分析了不同马铃薯品种内生细菌的多样性。Vanessa 等（2004）使用 16S rDNA-T-RFLP 技术分析了小麦根围光化细菌的群落结构。Zhao 等（2007）同时采用 16S rDNA-PCR-DGGE 方法和传统的平板分离方法研究了烟草叶片内生细菌的多样性，序列分析结果表明 DGGE 图谱中的一些条带的序列能和培养分离中的一些细菌相吻

合，另外通过 DGGE 分析还发现了一些培养方法中尚未出现的内生细菌。Zheng 等（2008）用 PCR-DGGE 结合电镜发现绿萍 *Azolla microphylla* 的内生细菌中以芽胞杆菌和蓝细菌为主要类群。

五、植物内生菌的应用

1. 植物内生菌在农业上应用

研究表明植物内生菌与病原菌具有相同的生态位，在植物体内与之竞争空间，同时与病原菌形成营养竞争的对抗关系，使病原菌因得不到正常的营养供给而消亡，从而增强宿主抵御病害的能力。另外，植物内生菌可以分泌抗生素、毒素等代谢物质，这些代谢物质能够诱导植物产生系统抗性。因此，对植物施用植物内生菌产生的抗菌剂、抗虫剂来增强植物的抗逆性，主要起到生物防治的作用，既减少了化学农药对环境的污染，又保证了植物产品的品质。吴蔼民等（2000）报道了内生菌 73a 和 Ala 对棉花黄萎病的田间防效及增产作用。田宏先等（2002）报道了马铃薯组织中的内生菌对马铃薯茎基腐病的田间防治及增产作用。Hinton 和 Bacon（1995）通过试验证明，玉米内生阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）作为种子保护剂，能有效防治玉米病害。夏正俊等（1997）已从棉株分离并用抗生素标记证明该内生细菌对棉花枯萎病具有良好的防效。另外，有报道称内生菌次生代谢物能够产生促进植物生长的激素类物质或促进植物对营养物质的吸收来刺激植物生长。例如，张集慧等（1999）从兰科药用植物中分离出 5 种内生真菌，并从这些真菌发酵液和菌丝体中分别提取出 5 种植物激素，如赤霉素、吲哚乙酸、脱落酸等，它们对兰花的生长发育有较好的促进作用。内生菌的次生代谢产物有杀虫特性。Daisy 等（2002）发现内生菌（*Muscodor vitigenus*）产生的一些毒素，导致昆虫拒食、体重减轻、生长发育受抑制，甚至死亡率增加等，起到很好的杀虫作用。禾本科植物内生菌产生的有机胺类、吡咯里西啶类、双吡咯烷类、吲哚双萜类等四大类多达 10 种的生物碱，对线虫和大多数食草昆虫具有较强的毒性（李强等，2006）。

2. 植物内生菌在医药上应用

研究表明内生菌代谢产物有抗肿瘤活性、抗生素活性、抗菌、抗病毒等作用。Gary 等（1997）从欧洲红豆杉中分离到内生真菌 *Acremonium* sp. 能产生一系列抗真菌、抗癌的肽类活性物质，其中白灰制菌素（leucinostatin）能很好地抑制人类的一些肿瘤细胞。Strobel 等（1999）从卫矛科著名药用植物雷公藤中分离到的内生真菌（*Cryptosporidiopsis* cf. *quercina*）能产生一种新型环肽抗生素 cryptocandin，对癣菌及白色念珠菌等人类病原真菌具有强烈抑杀作用，其最低抑菌浓度（MIC）与临床应用的抗真菌药两性霉素 B（amphotericin B）相当，具有良好开发前景。Castillo 等（2002）发现 *Kennedia nigriscans* 的一株内生链霉菌能够产生一类活性多肽 munumbicins，这类多肽不仅具有广谱的抗菌活性，而且对有耐药性的病原菌、寄生虫有很好的抑制作用。利用内生菌的次生代谢物质开发新的药物将是今后医药方面的研究方向之一。

3. 内生菌作为外源基因载体

由于内生菌在植物体内的适应性，一些研究者以内生菌为受体构建植物内生防病菌或杀虫工程菌，再将其引入植物体内，使植物起到与转基因防病杀虫植物相同或类似的作用，从而达生物防治的目的。Dowring 和 Thomson（2000）从苹果苗中分离出内生菌 *Pseudomonas fluorescens*，转入抗病 *chiA* 基因，再把这种携带 *chiA* 基因的内生菌接种到豆苗中，可以防治豆苗病原真菌 *Rhizoctomia solani*，他们还在甘蔗内生菌中转入抗虫基因 *crylAC7*，回接甘蔗，可以防治甘蔗钻心虫 *Eldana saccharin*a。美国 CGI 公司以内生细菌——木质棒形杆菌犬齿亚种（*Clavibacter xyli* subsp. *cyndontis*）为载体，将 BT 杀虫基因整合到染色体上构建杀虫工程细菌，这种杀虫工程菌从 1988 年开始已在美国 4 个州 12 个玉米杂交品种上进行大田试验，可使虫害损失率减轻 26%～72%。

此外发现内生菌有降解环境污染物的功能，如从珠江入海口红树中分离到的内生菌，有清除工业废水中的有害物质，起到净化海水的作用。而 Siciliano 等（2001）研究表明某些内生菌能够降解甲苯，并且能使其宿主植物产生对甲苯的抗性，这就使利用微生物接种植物进行环境修复提供了可能。植物内生菌为环境污染治理注入了新的血液，但其相关研究才刚刚开始，有待于进一步深入。

六、讨论

虽然内生菌的研究已经开展了多年，但是对于内生菌的界定还很模糊。一些人认为内生菌主要是指其生活史的某一阶段生活在植物组织内，使植株不发病或者暂时不表现出症状的一类微生物，不包括致病菌，它们的存在并未使植物的表型特征和功能有任何改变的微生物。然而由于环境等原因，有很多致病菌被弱化了，其能在植物体内大量存在但不使植物发病，这些致弱的致病菌在植物体内已经占据了一定的生态位，与寄主建立了一定的协作关系，已从外源菌转变为植物内生菌。另外，有许多内生菌在与植物协同进化过程中，能够分泌大量的植物生长激素类物质、抗生素物质等，促进植物生长或者诱导植物产生抗性，在一定程度上讲，内生菌改变了寄主植物的表型特征和功能。因此，作者认为，健康的植株经过严格的表面消毒，通过组织分离培养或者分子等其他方法得到的微生物，都属于内生菌范围，包括对宿主暂时没有伤害的潜伏性的病原菌和促生内生菌、拮抗菌等。

在内生菌生物学特性研究上，由于内生菌生活在植物这一特定的生境内，植物不同，环境不同，其生活的环境和营养条件也不同，现在没有一种理想的培养方法可以检测到所有的内生菌。另外，有很多的内生菌都是非可培养的，所以寻找一个切实可行的内生菌检测方法对于内生菌生物学和生态学研究尤为重要。

而对于内生菌群落多样性研究，由于研究条件和技术方法的限制，目前研究甚少，结论多不是很全面，但是 DGGE 等微生物免培养研究方法在植物内生菌多样性研究中的成功运用，为人们开辟了植物内生菌多样性研究的新思路。通过借鉴土壤微生物多样性研究思路与方法，如 DGGE、PLFA 等，来分析植物内生菌群落结构多样性，这些将是未来内生菌多样性研究的新方法。

因为内生菌的双重特性（拮抗性和致病性），所以在内生菌开发应用方面，除了开展内生菌在病虫害方面的开发和应用外，还要考虑其病理学上的特性。同时植物内生菌本身是一个生物活体，田间环境和植物体微生态环境中的许多因子都会影响内生菌防病作用的发挥，影响其稳定性，因此在利用内生菌进行大田防病时，必须考虑它的生态学、病理学和形态学等方面的影响。

总体来说，内生菌的生境特殊性决定了内生菌既有理论研究的广度和深度，又有多方面的应用潜力，是个潜力巨大、尚待开发的微生物新资源。随着分子生物学、生物化学和微生态学的发展，对内生菌的研究将更深入，内生菌在农业、医疗等方面的发挥的作用将更大。

第二节　柑橘内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

我国是柑橘工业大国之一，柑橘产业已成为推动我国新农村建设的支柱产业之一（Shan，2008）。然而，柑橘病害严重影响到柑橘产业的发展，柑橘黄龙病（Citrus Huanglongbing， HLB）是世界柑橘生产上最具毁灭性的病害之一（范国成等，2009）。柑橘黄龙病病原菌（*Candidatus liberibacter asiaticus*）是一种韧皮部杆菌属类细菌，属于革兰氏阴性菌。关于柑橘黄龙病的研究，在黄龙病分子检测（Ding *et al.*，2008）、传播虫媒、流行规律、病原菌基因组 DNA 序列（Subandiyah *et al.*，2000）、控制技术等方面已有过许多报道。作者前期研究发现，在感染黄龙病的柑橘植株上，存在着同个器官感染与否状态不同，如病株一部分叶（茎、根）感染，另一部分无感染；同个部位感染与否状态不同，如病株上部一部分叶（枝）感染，另一部分无感染。这种病株间不同器官、不同部位病原分布的差异性的原因，是否与植株内生菌的分布有关，关于这些在国内外的相关研究中未见报道。柑橘内生细菌的研究前人有过报道，Lacava 等（2004）从健康柑橘植株体内分离得到的萎蔫短小杆菌（*Curtobacterium flaccumfaciens*），能够明显减弱由苛养木杆菌（*Xylella fastidiosa*）引起的杂色褪绿病（Citrus Variegated chlorosis，CVC）的症状。Araújo 等（2002）从幼小柑橘叶片中分离得到很多细菌及真菌，其中可以引起柑橘黑斑病的病原菌（*Guignardia citricarpa*）所分泌的代谢产物可以抑制一些芽胞杆菌的生长。然而，关于柑橘黄龙病植株内生细菌的研究报道很少，仅见柑橘黄龙病植株和柑橘健康植株内生细菌种类存在一定差异的研究（Wang *et al.*，2010），而同一棵柑橘黄龙病植株不同部位内生细菌分布差异的研究未见报道。

植物内生菌几乎存在于所有目前已研究过的植物中，其分布广、种类多。研究表明，感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗动物危害等优势，比未感染植株更具生存竞争力。对于柑橘黄龙病植株，其黄龙病原在病株不同方位和部位的分布是否一致，不同方位、不同部位、不同黄龙病状态的柑橘器官内生细菌分布是否存在着差异，这些问题仍不清楚。本研究的目的是了解柑橘黄龙病病原在同一病株分布的异质性及其与内生细菌的相关性，用 Nested-PCR 检测方法对具有典型黄龙病病征的柑橘

不同部位叶片进行黄龙病病原的检测，并采用纯培养的方法对柑橘（红心柚）黄龙病病株不同方位（东面、西面、南面、北面、上部、中部、下部）叶片、枝条以及根部内生细菌进行分离、计数及分子鉴定，从而研究柑橘黄龙病发病植株内生细菌的多样性及内生细菌与黄龙病病原菌之间的相关性，为柑橘黄龙病的防治、内生细菌开发与利用奠定基础。研究方法如下。

二、研究方法

1）材料：柑橘样本采集时间为 2010 年 7 月 23 日；地点为顺昌北门水库边赵氏园艺技术研究所果树基地；经纬度分别为东经 117.8°，北纬 26.8°；柑橘品种为红心柚（*Citrus grandis* Osbeck cv. Chandler）；采集方法，选择一株具有典型黄龙病病征的红心柚植株，分别从东、西、南、北面取其上部、中部、下部共 12 个部位叶片、枝条若干份，并记录不同方位叶片症状，同时取其侧根若干段，置于 4℃冰箱保存备用。

2）柑橘内生细菌的分离与鉴定：柑橘内生细菌的分离参照蓝江林等（2008）的方法，略作修改。对采集样品表面进行严格消毒。在无菌条件下，将样品研磨成匀浆，并稀释为 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3} 共 3 个梯度样品悬浮液，分别取 200μl 涂布在 NA 平板上，28℃培养 24h，每份样品进行 3 个重复。观察菌落形态、颜色、边缘状态、透明度、表面干湿状态等特征，对菌株进行初步分类，统计菌落数量并挑取各部位具有代表性的单菌落进行纯化，保存备用。柑橘内生细菌的鉴定参考 Rainey 等（1996）的报道，扩增柑橘内生细菌 16S rDNA 的引物序列、扩增程序见表 5-4。将 PCR 产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。将测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 中同源性序列进行比对，按 16S rDNA 序列同源性最大的菌株归于同一物种计。用 ClustalX1.83 软件进行多序列比对，并用 Mega4.0 软件分析比对的结果，使用邻接法（Neibor-Joining，NJ）构建系统进化树。

表 5-4　PCR 引物序列及其扩增程序

分析步骤	引物序列	PCR 反应程序
第一步 Nested-PCR（外引物）	CG03F：5′-RGGGAAAGATTTTATTGGAG-3′； CG05R：5′-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3′	预变性 94℃ 3min；变性 94℃ 30s，53℃退火 30s，72℃延伸 45s，40 个循环；72℃后延伸 7min
第二部 Nested-PCR（内引物）	LJ74F：5′-CGGGCGATTAAGTTAGAGGT-3′； CG05R：5′-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3′	预变性 94℃ 3min；变性 94℃ 30s，53℃退火 30s，72℃延伸 30s，35 个循环；72℃后延伸 7min
16SrDNA（通用引物）	27F：5′-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′； 1525R：5′-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC -3′	预变性 94℃ 5min；变性 94℃ 30s，50℃退火 30s，延伸 72℃ 1min 30s，30 循环；72℃后延伸 10min

3）柑橘不同部位叶片黄龙病病原的分子检测：采用改良的十六烷基三甲基溴化铵法（CTAB 法）提取叶片的总 DNA。通过 Nested-PCR 检测柑橘黄龙病病原，引物序列、扩增程序见表 5-4。以本实验室现有柑橘黄龙病叶片 DNA 作为阳性对照，健康柑橘叶片 DNA 为阴性对照。25μl 的扩增体系中含有 1U *Taq* 酶，2.5μl 的 10×PCR Buffer，0.5μl 的

10mmol/L 的 4 种 dNTP，1μl 的 10μmol/L 的引物和 25ng 的 DNA 模板，每个反应重复 3 次。使用外引物进行第一轮扩增，内引物进行第二轮扩增，将第一次扩增的产物稀释 100 倍作为第二次扩增的模板。扩增产物在电压 90V，1.5%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，使用 UVP 凝胶成像系统照相。

4）柑橘黄龙病病原菌与内生细菌的相互关系：对采集的 12 个部位叶片进行黄龙病病原分子检测，将检测结果进行“1，0”数量化，用“1”代表该部位叶片携带黄龙病病原菌为阳性，用“0”代表该部位叶片没有携带黄龙病病原菌为阴性。对不同部位叶片内生细菌进行分离，根据 16S rDNA 鉴定结果对内生细菌进行分类并对其含量进行统计。用皮尔逊相关系数（Pearson correlation coefficient，PCC）分析黄龙病病原菌与叶片内生细菌的相互关系，将不同叶片黄龙病病原菌存在与否和不同内生细菌在叶片中的含量构建成矩阵，以柑橘叶片黄龙病病原及其内生细菌为指标，以不同部位叶片为样本。PCC 计算公式如下：

$$r=\frac{\sum XY-\frac{\sum X\sum Y}{N}}{\sqrt{\left[\sum X^2-\frac{(\sum X)^2}{N}\right]\left[\sum Y^2-\frac{(\sum Y)^2}{N}\right]}} \tag{5-1}$$

式中，变量 X 和 Y 分别表示柑橘黄龙病病原 X 的存在与否和内生细菌 Y 的含量；N 表示样本总数。对黄龙病病原菌与不同叶片内生细菌进行聚类分析，统计带黄龙病病原叶片与不带黄龙病病原叶片内生细菌的数量分布并构建矩阵，以柑橘叶片黄龙病病原菌和内生细菌为指标，以不同部位叶片黄龙病病原和内生细菌为样本，以马氏距离为尺度，采用可变类平均法进行系统聚类分析。

5）柑橘不同部位叶片内生细菌的相互关系：统计不同部位叶片内生细菌的种类及其含量，利用不同部位叶片及其内生细菌的含量构建矩阵，用最小显著性差异法（least significant difference，LSD）比较不同内生细菌在不同部位叶片中含量的差异。①以内生细菌为基础的不同部位叶片相关性分析，以不同种类内生细菌为指标，以不同方位柑橘叶片为样本，采用 PCC 分析不同部位叶片之间的相互关系。②以不同部位叶片为基础的内生细菌相关性分析，以不同部位的叶片为指标，以不同种类的内生细菌为样本，采用 PCC 分析不同内生细菌在不同叶片分布的相互关系。

6）柑橘不同部位枝条内生细菌的相互关系：统计不同部位枝条内生细菌的种类及其含量，利用不同部位枝条及其内生细菌的含量构建矩阵，用最小显著性差异法比较不同内生细菌在不同部位枝条中含量的差异。①以内生细菌为基础的不同部位枝条相关性分析，以不同种类内生细菌为指标，以不同方位柑橘枝条为样本，采用 PCC 分析不同部位枝条之间的相互关系。②以不同部位枝条为基础的内生细菌相关性分析，以不同部位枝条为指标，以不同种类的内生细菌为样本，采用 PCC 分析不同内生细菌在不同枝条分布的相互关系。

7）柑橘不同器官内生细菌群落结构多样性：柑橘各器官（叶、茎、根）内生细菌种群数量分布相关性分析，对从红心柚黄龙病植株叶片、枝条和根中分离得到的内生细菌种类和数量进行统计分析。利用不同器官与不同种类内生细菌的含量构建矩阵，以不同内生细菌数量为变量，分别以不同器官及其内生细菌为样本，采用 PCC 分析各器官之间

的相互关系及其内生细菌之间的相互关系。柑橘各器官（叶、茎、根）内生细菌种群结构聚类分析，以柑橘不同器官内生细菌含量为指标，以内生细菌为样本，利用不同器官与不同种类内生细菌的含量构建矩阵，以马氏距离为尺度，采用可变类平均法对不同内生细菌之间进行系统聚类分析。柑橘各器官（叶、茎、根）内生细菌种群多样性指数分析，将不同器官内生细菌含量作为数量测度，引入生态学多样性测度 Simpson（D）指数、Shannon（H'）指数、Pielou 指数等方法。Simpson（D）计算公式为：$D=1-\sum P_i$，式中，P_i 种内生细菌占该试验中总的内生细菌的个数比例。Shannon（H_1）计算公式为：$H' = -\sum P_i \ln P_i$，式中，$P_i=N_i/N$，N_i 为处理 i 的内生细菌个数，N 为该试验中总内生细菌个数。Pielou 指数（J）计算公式为：$J= -\sum P_i \ln P_i / \ln S$，式中，$S$ 为群落中的内生细菌的总种类数。

8）数据处理：内生细菌数量分析、相关分析和系统聚类分析所用软件为 SPSS1.6 统计软件。

三、柑橘黄龙病病株内生芽胞杆菌及其细菌分离与鉴定

根据菌落形态的差异，从红心柚黄龙病病株不同部位叶片、枝条和根部共分离出 26 株内生细菌，其中叶片 10 株，枝条 14 株，根部 2 株。利用 16S rDNA 鉴定（表 5-5），结果表明，26 株内生细菌分别属于 10 个属，其中芽胞杆菌属（*Bacillus*）10 株，短小杆菌属（*Curtobacterium*）4 株，埃希氏菌属（*Escherichia*）4 株，肠杆菌属（*Enterobacter*）2 株，短短芽胞杆菌（*Brevibacillus*）、短波单胞菌属（*Brevundimonas*）、鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）、甲基杆菌属（*Methylobacterium*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）细菌各一株。分离的芽胞杆菌属菌株属于 6 个不同的种，包括枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）、芽胞杆菌（*Bacillus* sp.）、弯曲芽胞杆菌（*B. flexus*）、高地芽胞杆菌（*B. altitudinis*）。

表 5-5　红心柚内生细菌 16S rDNA 序列鉴定结果

菌株	16S rDNA 序列收录号	微生物学名	中文名
1. FJAT-10074	HQ873726	*Bacillus pumilus*	短小芽胞杆菌
2. FJAT-10067	HQ873729	*Bacillus* sp.	芽胞杆菌
3. FJAT-10076	HQ873722	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌
4. FJAT-10072	HQ873730	*Escherichia coli*	大肠杆菌
5. FJAT-10746	HQ873716	*Curtobacterium flaccumfaciens*	萎蔫短小杆菌
6. FJAT-10721	HQ873707	*Curtobacterium pusillum*	极小短小杆菌
7. FJAT-10747	HQ873717	*Curtobacterium citreum*	柠檬色短小杆菌
8. FJAT-10726	HQ873711	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
9. FJAT-10722	HQ873713	*Bacillus flexus*	弯曲芽胞杆菌
10. FJAT-10748	HQ873708	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌
11. FJAT-10821	HQ873709	*Bacillus altitudinis*	高地芽胞杆菌
12. FJAT-10724	HQ873714	*Sphingomonas pseudosanguinis*	伪血鞘氨醇单胞菌
13. FJAT-10720	HQ873710	*Pseudomonas fluorescens*	荧光假单胞菌
14. FJAT-10760	HQ873719	*Brevundimonas vesicularis*	泡囊短波单胞菌

续表

菌株	16S rDNA 序列收录号	微生物学名	中文名
15. FJAT-10714	HQ873720	*Methylobacterium variabile*	甲基杆菌属
16. FJAT-10742	HQ873712	*Escherichia hermannii*	赫氏埃希菌
17. FJAT-10752	HQ873718	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
18. FJAT-11906	HQ873731	*Enterobacter amnigenus*	栖水肠杆菌
19. FJAT-11266	HQ873732	*Enterobacter asburiae*	阿氏肠杆菌

从内生细菌 16S rDNA 系统进化树（图 5-1）可以看出，柑橘黄龙病植株内生细菌分为两大类，第Ⅰ大类为革兰氏阳性菌，第Ⅱ大类为革兰氏阴性菌。第Ⅰ大类又可以分为芽胞杆菌属和短小杆菌属两个亚类，其中第Ⅰ亚类特点为低 G+C%细菌；第Ⅱ亚类特点为高 G+C%细菌。第Ⅱ大类也可分为两个亚类，第Ⅰ亚类包括泡囊短波单胞菌（*Brevundimonas vesicularis*）、伪血鞘氨醇单胞菌（*S. pseudosanguinis*）、甲基杆菌属（*M. variabile*），其特点是均属于 α-变形菌纲细菌；第Ⅱ亚类包括大肠杆菌（*E. coli*）、赫氏埃希菌（*E. hermannii*）、栖水肠杆菌（*E.amnigenus*）、阿氏肠杆菌（*E. asburiae*）、醋酸钙不动杆菌（*A. calcoaceticus*）、荧光假单胞菌（*P. fluorescens*），其特点是均属于 γ-变形菌纲。

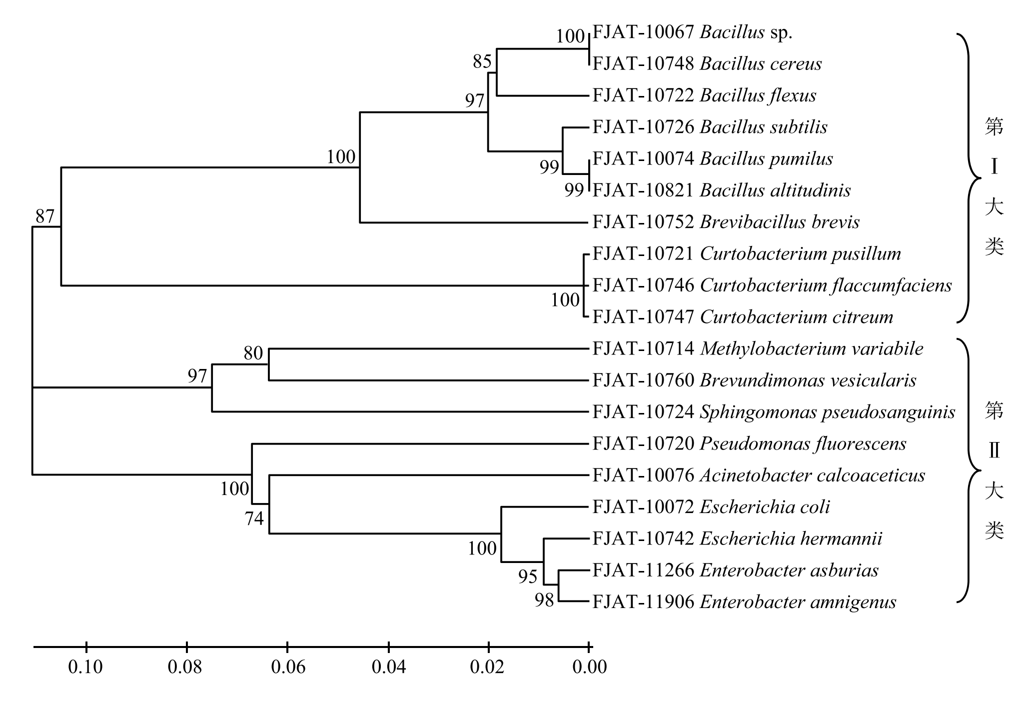


图 5-1　红心柚内生细菌系统进化树

Bootstrap 值依据 1000 次重复计算

四、柑橘不同部位叶片黄龙病病原分子检测

红心柚黄龙病病株不同部位叶片表型特征及其黄龙病病原检测结果见表5-6和图5-2。携带黄龙病病原的叶片组织和阳性对照均扩增出一条440bp的特异性条带，而健康叶片组织DNA和阴性对照未扩增出相同条带。检测结果表明，12份样品中有7份携带黄龙病病原，阳性检出率为58.3%，其中显性性状有4个，分别为东面上部、东面中部、西面下部和北面下部叶片；隐性性状有3个，分别为西面上部、西面中部和北面中部叶片。

表5-6　不同部位叶片黄龙病病征表型及其黄龙病病原检测结果

部位	东面		南面		西面		北面	
	表型	病原菌	表型	病原菌	表型	病原菌	表型	病原菌
上部	黄化	+	正常	–	正常	+	正常	–
中部	斑驳	+	正常	–	正常	+	正常	+
下部	正常	–	正常	–	黄化	+	黄化	+

注：“+ ”代表检测出黄龙病病原，“–”代表没有检测出黄龙病病原

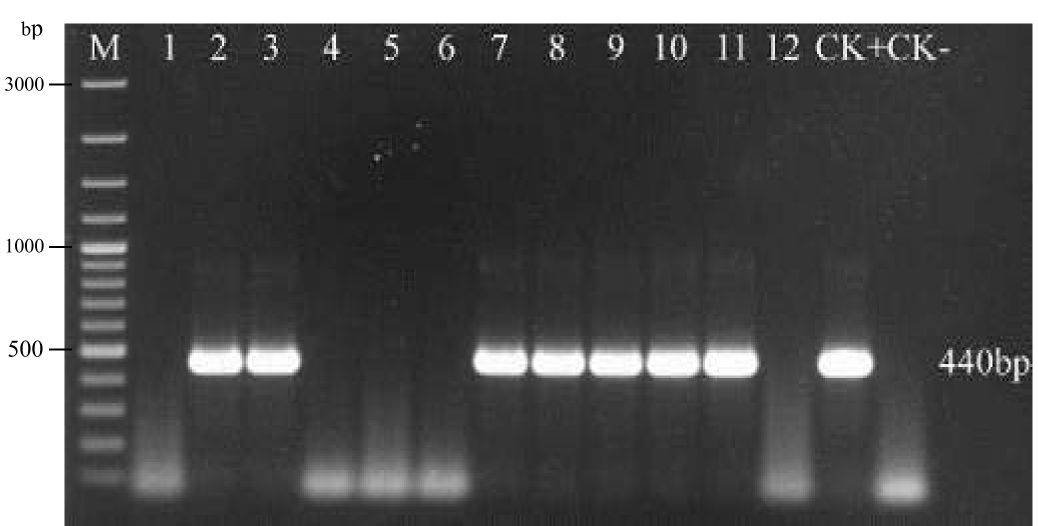


图5-2　Nested-PCR检测不同部位叶片黄龙病病原电泳图

M为Marker分子质量标准（3000bp、2000bp、1500bp、1200bp、1031bp、900bp、800bp、700bp、600bp、500bp、400bp、300bp、200bp、100bp）；1～12依次为北边上部、中部、下部，南边上部、中部、下部，西边上部、中部、下部，东边上部、中部、下部叶片；CK+为阳性对照，CK–为阴性对照

五、柑橘黄龙病病原菌与内生芽胞杆菌及其细菌的相互关系

1）柑橘不同部位叶片黄龙病病原菌存在情况及其内生细菌数量分布见表5-7，内生细菌*E. hermannii*和*E. coli*在叶片中分布量少，而内生细菌*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus*和*Bacillus* sp.存在于所有叶片之中。*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus*和*Bacillus* sp.在携带有黄龙病病原菌叶片中的含量低于没有携带黄龙病病原菌叶片。例如，*B. subtilis*在携

带有黄龙病病原菌叶片中的平均含量为 7.09×10³CFU/g，而在没有携带黄龙病病原菌叶片中的含量为 8.48×10³CFU/g。

表 5-7　红心柚不同部位的叶片所带黄龙病病原情况及内生细菌含量（单位：×10³CFU/g）

菌株	东			南			西			北		
	上部	中部	下部	上部	中部	下部	上部	中部	下部	上部	中部	下部
HLB 病原	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
FJAT-10078（*B. subtilis*）	6.9	6.7	7.9	8.5	6.7	9.8	6.4	9	5.4	9.5	7.9	7.3
FJAT-10060　（*B. cereus*）	7.6	8.4	9.5	7.2	5.8	6.1	8.8	7.9	6.4	6.7	5.9	8.3
FJAT-10074　（*B. pumilus*）	7.3	7.4	8.9	7.3	8.5	9.9	6.5	5.7	6.1	8.7	5.8	6.6
FJAT-10067　（*Bacillus sp.*）	7.2	8.1	9.6	8.3	7.9	10.2	7.4	6.9	5.4	9.2	6.4	5.1
FJAT-10076　（*Acinetobacter calcoaceticus*）	1.2	2.4	0	2.5	1.7	0	3.1	2.5	0	2.3	3.1	0
FJAT-10064　（*Escherichiahermannii*）	0.4	0	0	0	0.9	0	0	0	0	0	0	0.5
FJAT-10071　（*Escherichia coli*）	1.7	0	0	2.1	0	0	0	0	0	0	0	0.1

注：“1”代表该部位含有黄龙病病原，“0”代表该部位不含黄龙病病原

2）不同部位叶片内生细菌与黄龙病病原菌的 PCC 见表 5-8，内生细菌 *B. cereus* 和 *A. calcoaceticus* 与黄龙病病原菌不显著正相关，其 PCC 较低分别为 0.23 和 0.19。*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp.与黄龙病病原菌呈极显著负相关，其相关系数分别为–0.83 和–0.78。其他内生细菌与黄龙病病原菌之间存在负相关，但相关性不显著，如 *E. coli* 与黄龙病病原菌的 PCC 仅为–0.11。

表 5-8　不同部位叶片内生细菌与黄龙病病原菌的 PCC

PCC	*X*1	*X*2	*X*3	*X*4	*X*5	*X*6	*X*7	*X*8
HLB Pathogen（*X*1）	1.00							
FJAT-10078（*B. subtilis*）（*X*2）	–0.53	1.00						
FJAT-10060　（*B. cereus*）（*X*3）	0.23	–0.16	1.00					
FJAT-10074　（*B. pumilus*）（*X*4）	–0.83**	0.44	–0.10	1.00				
FJAT-10067　（*Bacillus* sp.）（*X*5）	–0.78**	0.60	0.03	0.86	1.00			
FJAT-10076　（*Acinetobacter calcoaceticus*）（*X*6）	0.19	0.08	–0.05	–0.39	–0.01	1.00		
FJAT-10064　（*Escherichiahermannii*）（*X*7）	–0.09	–0.31	–0.22	0.13	–0.24	–0.20	1.00	
FJAT-10071　（*Escherichia coli*）（*X*8）	–0.11	0.04	0.01	–0.04	0.03	0.11	0.06	1.00

** 表示 $P<0.01$ 在 0.01 水平极显著相关

3）不同部位叶片黄龙病病原及其内生细菌的聚类分析，对表 5-8 数据进行规格化，以马氏距离为尺度，采用可变类平均法，对黄龙病病原菌和叶片内生细菌进行聚类分析（表 5-9 和图 5-3），当马氏距离为 6.18 时，可以分为 3 类。第 I 类特征为内生细菌存在于所有部位叶片中，*B. subtilis* 和 *B. cereus* 与黄龙病病原菌之间的相关性较小；第 II 类

特征为内生细菌与黄龙病病原菌存在负相关性，内生细菌 *B. pumilus* 和 *Bacillus* sp.分别与黄龙病病原菌存在负相关；第Ⅲ类特征为内生细菌只存在于特定部位叶片中，包括了 3 种内生细菌（*A. calcoaceticus*、*E. hermannii* 和 *E. coli*）。

表 5-9　聚类过程

T	*I*	*J*	距离
1	3	2	2.82
2	5	4	3.40
3	7	6	3.46
4	8	6	3.77
5	2	1	4.92
6	4	1	6.18
7	6	1	8.66

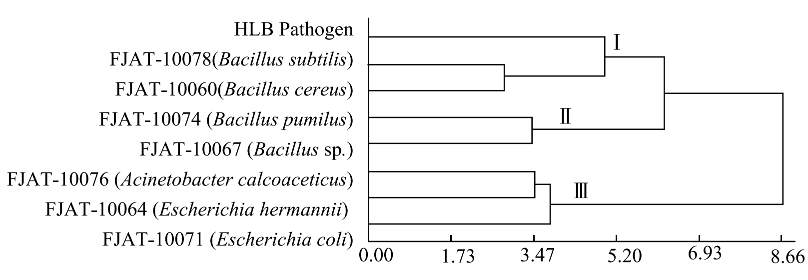


图 5-3　不同部位叶片内生细菌与黄龙病病原菌之间的聚类分析

六、柑橘不同部位叶片内生芽胞杆菌及其细菌相互关系

1）不同方位叶片中内生菌的分布量不同。由表 5-10 可知，内生细菌在不同方位叶片中的分布具有多态性，可分为完全分布和不完全分布。*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp.存在于所有部位的叶片之中，为完全分布，而 *A. calcoaceticus*、*E. hermannii*、*E.coli* 只在特定部位叶片中有分布，为不完全分布。*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp.这 4 种菌在各部位叶片的平均含量差异不显著，但与 *A. calcoaceticus*、*E. hermannii* 和 *E. coli* 3 种菌在各部位叶片的平均含量存在显著差异（表 5-11）。内生细菌的平均含量在上、中、下不同高度叶片差异不明显（表 5-12），在东、西、南、北不同朝向叶片存在显著差异（表 5-13）。

表 5-10　红心柚黄龙病病株不同部位叶片内生细菌含量

叶片部位		内生细菌含量/（$\times10^3$CFU/g）						
		FJAT-10078（*Bacillus subtilis*）*X*1	FJAT-10060（*Bacillus cereus*）*X*2	FJAT-10074（*Bacillus pumilus*）*X*3	FJAT-10067（*Bacillus* sp.）*X*4	FJAT-10076（*Acinetobacter calcoaceticus*）*X*5	FJAT-10064（*Escherichia hermannii*）*X*6	FJAT-10071（*Escherichia coli*）*X*7
东	上部	6.9	7.6	7.3	7.2	1.2	0.4	1.7
	中部	6.7	8.4	7.4	8.1	2.4	0	0
	下部	7.9	9.5	8.9	9.6	0	0	0
南	上部	8.5	7.2	7.3	8.3	2.5	0	2.1
	中部	6.7	5.8	8.5	7.9	1.7	0.9	0
	下部	9.8	6.1	9.9	10.2	0	0	0
西	上部	6.4	8.8	6.5	7.4	3.1	0	0
	中部	9	7.9	5.7	6.9	2.5	0	0
	下部	5.4	6.4	6.1	5.4	0	0	0

续表

叶片部位		内生细菌含量/（×10³CFU/g）						
		FJAT-10078（*Bacillus subtilis*）*X*1	FJAT-10060（*Bacillus cereus*）*X*2	FJAT-10074（*Bacillus pumilus*）*X*3	FJAT-10067（*Bacillus* sp.）*X*4	FJAT-10076（*Acinetobacter calcoaceticus*）*X*5	FJAT-10064（*Escherichia hermannii*）*X*6	FJAT-10071（*Escherichia coli*）*X*7
北	上部	9.5	6.7	8.7	9.2	2.3	0	0
	中部	7.9	5.9	5.8	6.4	3.1	0	0
	下部	7.3	8.3	6.6	5.1	0	0.5	0.1

表 5-11　红心柚不同内生细菌在叶片中的含量统计

	菌株名称	含量均值/（×10³CFU/g）	5%显著水平
FJAT-10078	（*B. subtilis*）	7.6667	a
FJAT-10067	（*Bacillus* sp.）	7.6417	a
FJAT-10074	（*B. pumilus*）	7.3917	a
FJAT-10060	（*B. cereus*）	7.3833	a
FJAT-10076	（*Acinetobacter calcoaceticus*）	1.5667	b
FJAT-10071	（*Escherichia coli*）	0.3250	c
FJAT-10064	（*Escherichiahermannii*）	0.1500	c

注：同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher’s LSD test）

表 5-12　红心柚内生细菌在不同水平叶片中的含量统计

叶片水平	含量均值/（×10³CFU/g）	5%显著水平
上部	4.8857	a
中部	4.4857	a
下部	4.3964	a

注：同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher’s LSD test）

表 5-13　红心柚内生细菌在不同方向叶片中的含量统计

叶片方向	含量均值/（×10³CFU/g）	5%显著水平
南面	4.9238	a
东面	4.8190	ab
北面	4.4476	ab
西面	4.1667	b

注：同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher’s LSD test）

2）对柑橘不同部位叶片进行 PCC 分析结果见表 5-14。不同部位叶片之间的相关性很高，且都是在 0.01 水平达极显著正相关，其中东面上部与东面下部、东面上部与西面下部、东面中部与西面上部、东面下部与西面下部叶片之间的相关系数最高，达 0.99。

南面下部与北面下部叶片之间的相关系数最低，为 0.87。

表 5-14　红心柚不同部位叶片之间的 PCC

PCC	$X1$	$X2$	$X3$	$X4$	$X5$	$X6$	$X7$	$X8$	$X9$	$X10$	$X11$	$X12$
东面上部 $X1$	1.00											
东面中部 $X2$	0.97**	1.00										
东面下部 $X3$	0.99**	0.98**	1.00									
南面上部 $X4$	0.97**	0.95**	0.95**	1.00								
南面中部 $X5$	0.90**	0.95**	0.96**	0.93**	1.00							
南面下部 $X6$	0.94**	0.91**	0.94**	0.95**	0.98**	1.00						
西面上部 $X7$	0.94**	0.99**	0.94**	0.93**	0.89**	0.84**	1.00					
西面中部 $X8$	0.93**	0.94**	0.92**	0.95**	0.88**	0.88**	0.95**	1.00				
西面下部 $X9$	0.99**	0.97**	0.99**	0.94**	0.95**	0.93**	0.94**	0.92**	1.00			
北面上部 $X10$	0.94**	0.95**	0.94**	0.98**	0.98**	0.98**	0.91**	0.94**	0.93**	1.00		
北面中部 $X11$	0.91**	0.94**	0.89**	0.96**	0.91**	0.91**	0.93**	0.98**	0.90**	0.97**	1.00	
北面下部 $X12$	0.96**	0.93**	0.95**	0.91**	0.88**	0.87**	0.91**	0.93**	0.98**	0.89**	0.88**	1.00

**表示 $P<0.01$ 在 0.01 水平极显著相关

表 5-15　不同部位叶片内生细菌之间的 PCC

PCC	$X1$	$X2$	$X3$	$X4$	$X5$	$X6$	$X7$
FJAT-10078（*B. subtilis*）（$X1$）	1.00						
FJAT-10060（*B. cereus*）（$X2$）	–0.1563	1.00					
FJAT-10074（*B. pumilus*）（$X3$）	0.4386	–-0.1047	1.00				
FJAT-10067（*B. thuringiensis*）（$X4$）	0.6015*	0.0296	0.8564**	1.00			
FJAT-10076（*Acinetobacter calcoaceticus*）（$X5$）	0.0827	–0.0549	–0.3913	–0.0097	1.00		
FJAT-10064（*Escherichiahermannii*）（$X6$）	–0.3134	–0.2223	0.1296	–0.2384	–0.1978	1.00	
FJAT-10071（*Escherichia coli*）（$X7$）	0.0375	0.0075	–0.0389	0.0294	0.1143	0.0605	1.00

*表示 $P<0.05$ 在 0.05 水平显著相关，**表示 $P<0.01$ 在 0.01 水平显著相关

3）对不同部位柑橘叶片内生细菌进行 PCC 分析，结果见表 5-15。不同内生细菌之间相关性不同，有些表现为正相关性，如 *B. pumilus* 与 *Bacillus* sp.为正相关，且相关系数最大为 0.8564，有些表现为负相关，如 *B. pumilus* 与 *Acinetobacter calcoaceticus* 为负相关，且负相关系数最大为–0.3913。

七、柑橘不同部位枝条内生芽胞杆菌及其细菌的相互关系

1）不同部位枝条内生细菌的分布量不同，结果见表 5-16。内生细菌 *B. subtilis* 在各个部位枝条中均有分布，为完全分布，其他的内生细菌只存在于特定部位枝条中，如 *C. pusillum* 仅存在于东面中部的枝条，为不完全分布。枝条内生细菌 *C. citreum*、*C. flaccumfaciens*、*B. flexus*、*E. hermannii*、*M. variabile*、*B. brevis*、*P. fluorescens*、*C. pusillum*、

S. pseudosanguinis、*B. altitudinis* 和 *B. vesicularis* 在不同部位枝条的平均含量差异不明显，但它们与 *B. subtilis* 和 *B. cereus* 的平均含量存在显著差异（表 5-17）。枝条内生菌在上、中、下 3 个不同高度枝条中平均含量差异不明显（表 5-18），但在东、西、南、北 4 个不同朝向枝条中平均含量差异显著（表 5-19）。

表 5-16　不同部位的枝条内生细菌种类和含量　　（单位：$\times 10^3$CFU/g）

菌株	东			南			西			北		
	上部	中部	下部	上部	中部	下部	上部	中部	下部	上部	中部	下部
FJAT-10726（*Bacillus subtilis*）	1.41	1.63	1.43	1.42	1.72	1.44	1.38	1.49	1.47	1.5	1.46	1.36
FJAT-10748（*Bacillus cereus*）	0.45	0.12	0.21	0	0.87	0.71	0.59	0.43	0	0.81	0.55	0.71
FJAT-10722（*Bacillus flexus*）	0	0.12	0.31	0	0	0.11	0	0	0	0	0	0.16
FJAT-10821（*Bacillus altitudinis*）	0	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0	0	0.25
FJAT-10750（*Curtobacterium flaccumfaciens*）	0.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.39	0
FJAT-10721（*Curtobacterium pusillum*）	0	0.47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-10747（*Curtobacterium citreum*）	0	0	0.44	0	0.51	0	0	0	0	0	0	0
FJAT-10742（*Escherichia hermannii*）	0	0	0	0	0.23	0	0	0	0	0.39	0	0
FJAT-10720（*Pseudomonas fluorescens*）	0	0	0.18	0	0	0	0.13	0	0	0.12	0	0.09
FJAT-10724（*Sphingomonas pseudosanguinis*）	0.12	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0.14
FJAT-10752（*Brevibacillus brevis*）	0	0	0	0	0	0.21	0	0	0	0.33	0	0
FJAT-10760（*Brevundimonas vesicularis*）	0	0	0	0	0	0.18	0	0	0	0.06	0	0
FJAT-10714（*Methylobacterium variabile*）	0.21	0	0	0	0	0.19	0.16	0	0	0	0	0

2）对不同部位枝条进行 PCC 分析，结果见表 5-20，不同部位枝条之间在 0.01 水平存在极显著正相关，其中南面上部和西面下部枝条之间相关系数为 1，为完全正相关。东面下部与北面上部枝条之间的相关系数最小为 0.8。

表 5-17　红心柚不同内生细菌在枝条中的含量统计

菌株	含量均值/（$\times 10^3$CFU/g）	5%显著水平
FJAT-10726（*Bacillus subtilis*）	1.4758	a
FJAT-10748（*Bacillus cereus*）	0.4542	b
FJAT-10747（*Curtobacterium citreum*）	0.0792	c
FJAT-10750（*Curtobacterium flaccumfaciens*）	0.0683	c
FJAT-10722（*Bacillus flexus*）	0.0583	c
FJAT-10742（*Escherichia hermannii*）	0.0517	c
FJAT-10714（*Methylobacterium variabile*）	0.0467	c
FJAT-10752（*Brevibacillus brevis*）	0.045	c
FJAT-10720（*Pseudomonas fluorescens*）	0.0433	c

续表

菌株	含量均值/（×10^3CFU/g）	5%显著水平
FJAT-10721（*Curtobacterium pusillum*）	0.0392	c
FJAT-10724（*Sphingomonas pseudosanguinis*）	0.0325	c
FJAT-10821（*Bacillus altitudinis*）	0.0283	c
FJAT-10760（*Brevundimonas vesicularis*）	0.0200	c

注：同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher's LSD test）

表 5-18　红心柚内生细菌在不同水平枝条中的含量统计

枝条水平	含量均值/（×10^3CFU/g）	5%显著水平
上部	0.1962	a
中部	0.1823	a
下部	0.1800	a

注：同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher's LSD test）

表 5-19　红心柚内生细菌在不同方向叶片中的含量统计

枝条方向	含量均值/（× 10^3CFU/g）	5%显著水平
北面	0.2133	a
西面	0.2003	ab
东面	0.1931	ab
南面	0.1449	b

注：同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher's LSD test）

表 5-20　不同部位枝条的 PCC

PCC	*X*1	*X*2	*X*3	*X*4	*X*5	*X*6	*X*7	*X*8	*X*9	*X*10	*X*11	*X*12
东面上部 *X*1	1.0000											
东面中部 *X*2	0.86**	1.0000										
东面下部 *X*3	0.84**	0.89**	1.0000									
南面上部 *X*4	0.91**	0.95**	0.92**	1.0000								
南面中部 *X*5	0.87**	0.82**	0.90**	0.84**	1.0000							
南面下部 *X*6	0.91**	0.85**	0.84**	0.87**	0.92**	1.0000						
西面上部 *X*7	0.94**	0.88**	0.88**	0.90**	0.94**	0.98**	1.0000					
西面中部 *X*8	0.95**	0.93**	0.92**	0.95**	0.94**	0.97**	0.98**	1.0000				
西面下部 *X*9	0.91**	0.96**	0.93**	1.00**	0.86**	0.88**	0.91**	0.96**	1.0000			
北面上部 *X*10	0.86**	0.81**	0.80**	0.83**	0.93**	0.94**	0.94**	0.94**	0.84**	1.0000		
北面中部 *X*11	0.98**	0.87**	0.86**	0.90**	0.91**	0.93**	0.95**	0.96**	0.91**	0.90**	1.0000	
北面下部 *X*12	0.90**	0.84**	0.85**	0.87**	0.92**	0.96**	0.96**	0.96**	0.87**	0.92**	0.93**	1.0000

**表示 P<0.01 在 0.01 水平显著相关

3）柑橘不同部位枝条的内生细菌间相关系数见表 5-21，除 *Brevibacillus brevis* 和 *Brevundimonas vesicularis* 的相关系数为 0.74，呈极显著正相关，*E. hermannii* 与 *Brevibacillus brevis* 的相关系数为 0.68，呈显著正相关，其余内生细菌之间的相关性不明显。

表 5-21　不同部位枝条的内生细菌含量相关系数

PCC	*X*1	*X*2	*X*3	*X*4	*X*5	*X*6	*X*7	*X*8	*X*9	*X*10	*X*11	*X*12	*X*13
*Bacillus subtilis X*1	1												
*Bacillus cereus X*2	0.13	1											
*Bacillus fleXus X*3	–0.16	–0.14	1										
*Bacillus altitudinis X*4	–0.38	0.35	0.37	1									
*Curtobacterium flaccumfaciens X*5	–0.19	0.07	–0.28	–0.18	1								
*Curtobacterium pusillum X*6	0.47	–0.34	0.2	–0.12	–0.13	1							
*Curtobacterium citreum X*7	0.49	0.17	0.4	–0.18	–0.2	–0.13	1						
*Escherichia hermannli X*8	0.46	0.55	–0.27	–0.17	–0.19	–0.13	0.27	1					
*Pseudomonas fluorescensX*9	–0.37	0.17	0.55	0.14	–0.3	–0.2	0.28	0.22	1				
Sphingomonas pseudosanguinis 10	–0.47	–0.12	–0.01	0.5	0.24	–0.17	–0.26	–0.25	–0.1	1			
*Brevibacillus brevis X*11	0	0.47	–0.07	0.04	–0.19	–0.13	–0.19	0.68*	0.2	–0.25	1		
*Brevundimonas vesicularis X*12	–0.08	0.37	0.1	0.22	–0.18	–0.12	–0.17	0.15	–0.08	–0.23	0.74**	1	
*Methylobacterium variabile X*13	–0.37	0.24	–0.13	0.02	0.35	–0.17	–0.26	–0.25	–0.06	0.13	0.15	0.46	1

* 表示 $P<0.05$ 在 0.05 水平显著相关，**表示 $P<0.01$ 在 0.01 水平极显著相关

八、柑橘黄龙病病株不同器官内生芽胞杆菌及其细菌种群的相互关系

1）柑橘内生细菌种群数量分布特性：不同内生细菌在红心柚黄龙病植株不同器官的分布及其含量不同（表 5-22）。*Enterobacter amnigenus* 和 *E.asburiae* 仅在根部分布，*Brevibacillus brevis*、*M. variabile*、*Brevundimonas vesicularis*、*P. fluorescens*、*S. pseudosanguinis*、*Bacillus altitudinis*、*B. flexus*、*Curtobacterium citreum*、*C. pusillum* 和 *C. flaccumfaciens* 仅在枝条分布，*Escherichia coli*、*A. calcoaceticus*、*Bacillus* sp.和 *B. pumilus* 仅在叶片分布，*B. subtilis*、*B. cereus* 和 *E. hermannii* 在根部和叶片均有分布。各内生细菌在根部和叶片分布总量相当，分别为 3.5×10^4CFU/g 和 3.21×10^4CFU/g，枝条分布总量较小为 0.24×10^4CFU/g。

表 5-22　内生细菌在红心柚内部的数量分布　　（单位：$\times10^3$CFU/g）

菌株	根	枝条	叶
FJAT-10726（*B. subtilis*）	0	1.480	7.6667
FJAT-10748（*B. cereus*）	0	0.450	7.383
FJAT-10074（*B. pumilus*）	0	0	7.391
FJAT-10067（*Bacillus* sp.）	0	0	7.6417

续表

菌株	根	枝条	叶
FJAT-10076（*Acinetobacter calcoaceticus*）	0	0	1.566
FJAT-10064（*Escherichiahermannii*）	0	0.052	0.150
FJAT-10071（*Escherichia coli*）	0	0	0.325
FJAT-10750（*Curtobacterium flaccumfaciens*）	0	0.068	0
FJAT-10721（*Curtobacterium pusillum*）	0	0.039	0
FJAT-10747（*Curtobacterium citreum*）	0	0.079	0
FJAT-10722（*B. flexus*）	0	0.058	0
FJAT-10821（*B. altitudinis*）	0	0.028	0
FJAT-10724（*Sphingomonas pseudosanguinis*）	0	0.033	0
FJAT-10720（*Pseudomonas fluorescens*）	0	0.043	0
FJAT-10760（*Brevundimonas vesicularis*）	0	0.020	0
FJAT-10714（*Methylobacterium variabile*）	0	0.047	0
FJAT-10752（*B. brevis*）	0	0.045	0
FJAT-11906（*Enterobacter amnigenus*）	21.7	0	0
FJAT-11266（*Enterobacter asburiae*）	13.3	0	0
合计	35	2.442	32.1234

2）柑橘黄龙病植株不同器官的 PCC 分析：结果见表 5-23，叶片与枝条之间的相关系数为 0.55，在 0.05 水平呈现显著正相关。根部与枝条，根部与叶片之间的相关性不显著，相关系数分别为–0.1300 和–0.1900，呈现负相关性。

表 5-23　红心柚不同器官的 PCC

器官	*X*1	*X*2	*X*3
根 *X*1	1.0000		
枝条 *X*2	–0.1300	1.0000	
叶片 *X*3	–0.1900	0.5500*	1.0000

* 表示 $P<0.05$ 在 0.05 水平显著相关

3）柑橘黄龙病病株内生细菌的 PCC 分析：结果见表 5-24，相同器官的内生细菌之间在 0.01 水平呈极显著正相关，如叶片上的两株内生细菌 *B. pumilus* 与 *Bacillus* sp.之间的相关系数为 1。不同器官内生细菌之间呈负相关，但相关性不显著，如叶片内生细菌 *B. cereus* 与枝条内生细菌 *C. flaccumfaciens* 之间的相关系数为–0.45。

4）柑橘内生细菌群落结构聚类分析：以马氏距离为尺度，采用可变类平均法，对红心柚黄龙病病株内生细菌进行聚类分析（表 5-25），当马氏距离为 27.23 时，柑橘黄龙病病株内生细菌可以分为三大类（图 5-4）。

第Ⅰ大类包括 *B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp.共 4 种芽胞杆菌，其特征是在不同部位叶片均有分布，为完全分布类型，且分布量较大。第Ⅰ大类又可分为两个亚类，第一亚类包括 *B. subtilis* 和 *B. cereus*，其特征为枝条和叶片分布特性，即在不同部位的枝条和叶片均有分布；第二亚类包括 *B.pumilus* 和 *Bacillus* sp.，其特征为叶片分布

特性。

表 5-24　红心柚黄龙病病株内生细菌 PCC

种类		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
FJAT-10726；FJAT-10078（*B. subtilis*）	X1	1.00									
FJAT-10748；FJAT-10060（*B. cereus*）	X2	0.99**	1.00								
FJAT-10074（*B. pumilus*）	X3	0.98*	1.00**	1.00							
FJAT-10067（*Bacillus* sp.）	X4	0.98*	1.00**	1.00**	1.00						
FJAT-10076（*Acinetobacter calcoaceticus*）	X5	0.98*	1.00**	1.00**	1.00**	1.00					
FJAT-10064 ； FJAT-10064（*Escherichiahermannii*）	X6	0.99*	0.96*	0.94	0.94	0.94	1.00				
FJAT-10071（*Escherichia coli*）	X7	0.98*	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	0.94	1.00			
FJAT-10750（*Curtobacterium flaccumfaciens*）	X8	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00		
FJAT-10721（*Curtobacterium pusillum*）	X9	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00	
FJAT-10747（*Curtobacterium citreum*）	X10	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00
FJAT-10722（*B. fleXus*）	X11	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-10821（*B. altitudinis*）	X12	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-10724（*Sphingomonas pseudosanguinis*）	X13	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-10720（*Pseudomonas fluorescens*）	X14	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-10760（*Brevundimonas vesicularis*）	X15	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-10714（*Methylobacterium variabile*）	X16	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-10752（*Brevibacillus brevis*）	X17	−0.33	−0.45	−0.50	−0.50	−0.50	−0.17	−0.50	1.00**	1.00**	1.00**
FJAT-11906（*Enterobacter amnigenus*）	X18	−0.65	−0.55	−0.50	−0.50	−0.50	−0.77	−0.5	−0.50	−0.50	−0.50
FJAT-11266（*Enterobacter asburiae*）	X19	−0.65	−0.55	−0.50	−0.50	−0.50	−0.77	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50
FJAT-10726；FJAT-10078（*Bacillus subtilis*）	X1										
FJAT-10748；FJAT-10060（*B. cereus*）	X2										
FJAT-10074（*B. pumilus*）	X3										
FJAT-10067（*Bacillus* sp.）	X4										
FJAT-10076（*Acinetobacter calcoaceticus*）	X5										
FJAT-10064 ；FJAT-10064（*Escherichia hermannii*）	X6										
FJAT-10071（*Escherichia coli*）	X7										
FJAT-10750（*Curtobacterium flaccumfaciens*）	X8										
FJAT-10721（*Curtobacterium pusillum*）	X9										

续表

种类		X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19
FJAT-10747（*Curtobacterium citreum* ）	X10									
FJAT-10722（*B. fleXus*）	X11	1.00								
FJAT-10821（*B. altitudinis*）	X12	1.00**	1.00							
FJAT-10724（*Sphingomonas pseudosanguinis*）	X13	1.00**	1.00**	1.00						
FJAT-10720（*Pseudomonas fluorescens*）	X14	1.00**	1.00**	1.00**	1.00					
FJAT-10760（*Brevundimonas vesicularis*）	X15	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	1.00				
FJAT-10714（*Methylobacterium variabile*）	X16	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	1.00			
FJAT-10752（*Brevibacillus brevis*）	X17	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	1.00**	1.00		
FJAT-11906（*Enterobacter amnigenus*）	X18	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	1.00	
FJAT-11266（*Enterobacter asburiae*）	X19	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	−0.50	1.00**	1.00

*表示 $P<0.05$ 在 0.05 水平显著相关，**表示 $P<0.01$ 在 0.01 水平极显著相关

表 5-25　聚类过程

T	*I*	*J*	距离
1	17	16	0.2829
2	16	14	0.3670
3	13	12	0.4862
4	8	6	0.5559
5	14	9	0.5872
6	15	12	0.7417
7	10	6	0.9456
8	4	3	0.9476
9	11	9	1.0256
10	12	9	1.4409
11	7	6	1.5077
12	2	1	3.5496
13	6	5	3.6836
14	9	5	6.8378
15	3	1	8.5452
16	19	18	10.6831
17	18	5	27.1183
18	5	1	45.3785

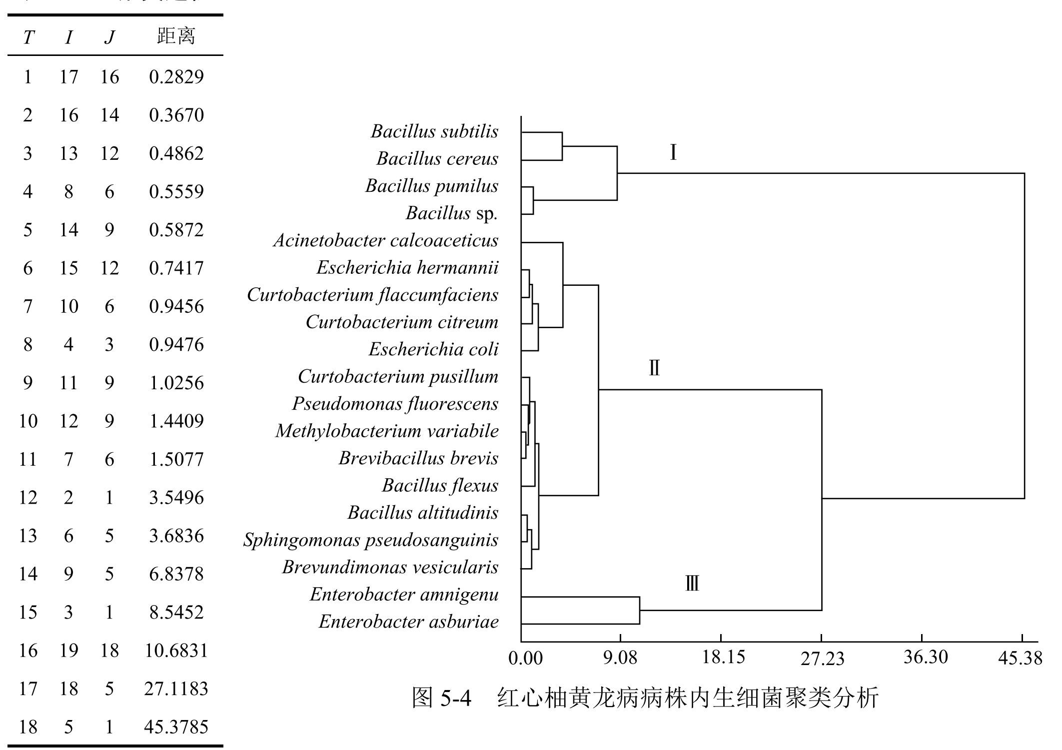


图 5-4　红心柚黄龙病病株内生细菌聚类分析

第Ⅱ大类包括 *A. calcoaceticus*、*Escherichia hermannii*、*E. coli*、*C. flaccumfaciens*、*C. pusillum*、*C. citreum*、*B. flexus*、*B. altitudinis*、*S. pseudosanguinis*、*P. fluorescens*、*Brevundimonas vesicularis*、*M. variabile* 和 *Brevibacillus brevis*，其特征是在各器官中均为

不完全分布类型，且分布量不均匀，在有些部位分布量较大，有些部位分布量小或不分布。第Ⅱ大类又可分为两个亚类，第一亚类包括 *A. calcoaceticus*、*E. hermannii*、*E. coli*、*C. flaccumfaciens* 和 *C. citreum*，其特征是这类内生细菌在不同器官、不同部位分布量不均匀，且平均含量中等。第二亚类包括 *C. pusillum*、*Bacillus flexus*、*B. altitudinis*、*S. pseudosanguinis*、*P. fluorescens*、*Brevundimonas. vesicularis*、*M. variabile* 和 *Brevibacillus brevis*，其特征是枝条分布特性，即这类内生细菌只存在于枝条之中，且平均含量较小。

第Ⅲ大类包括 *Enterobacter amnigenus* 和 *E. asburiae*，其特点是根部分布特性，即这类内生细菌仅存在于根部且其含量较大。

柑橘内生细菌群落结构的多样性分析：柑橘不同器官内生细菌的多样性指数不同（表5-26），枝条的 Simpson（*D*）指数最高，为 1.0063；其次是叶片，为 0.8032；根部最低，为 0.4851；叶片的 Shannon-Weiner（H_1）指数最高，为 2.2771；其次是枝条，为 2.0663；根部最低，为 0.9580；Pielou 均匀度指数最高值出现在根部，为 0.9580；其次是叶片，为 0.8111；枝条最低，为 0.5584。

表 5-26　不同器官内生细菌的多样性指数

植物器官	Simpson（*D*）	Shannon（H_1）	均匀度（*J*）
根	0.4851	0.9580	0.9580
枝条	1.0063	2.0663	0.5584
叶片	0.8032	2.2771	0.8111

九、讨论

研究植物内生细菌群落多样性可以选择多种指标，如磷脂脂肪酸（PLFA）（蓝江林等，2010）、变性梯度凝胶电泳（DGGE）（Garbeva *et al.*，2001）、物理芯片（phylochip Arrays）和 16S rRNA 序列等，作者选用 16S rRNA 方法鉴定分离的柑橘黄龙病内生细菌，得到 10 个属 19 个种的柑橘内生细菌。王爱华等（2010）根据细菌 16S rDNA 序列对柑橘黄龙病病株叶脉内生细菌的多样性进行了研究，其分离到的包括芽胞杆菌属（*Bacillus*）等 9 个属的内生细菌，其中 6 个属的细菌与本研究的不同。研究分离的柑橘植株内生细菌大多为土壤微生物种类，其中假单胞菌属（*Pseudomonas*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）为最常见的属（Quadt-Hallmann *et al.*，1997）。甲基杆菌属（*Methylobacterium*）（Araujo *et al.*，2002）、短芽胞杆菌属（*Brevibacillus*）（崔林等，2003）、鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）（Ulrich *et al.*，2008）、短波单胞菌属（*Brevundimonas*）（车建美等，2010），这些细菌已经从很多植物体内分离得到，而且部分菌属存在于柑橘植株内，对其中大部分属的生理特性都已经有了一定程度的研究。研究分离得到的柑橘黄龙病病株内生细菌中，芽胞杆菌属的种类和数量在叶片和枝条中都占有绝对的优势。这一结果与张铎等（2008）从棉花、卢云和罗明（2004）从哈密瓜、高增贵等（2004）从玉米中分离得到植物内生菌的优势菌株为芽胞杆菌属相一致。因为

芽胞杆菌属等可以分泌一些激素（Ali *et al.*，2008）、抗生素（Tabbene *et al.*，2009）等生长因子，对植物本身生长和病害防御有很重要的作用。根部内生细菌的种类单一，仅仅只有肠杆菌属。这种情况可能是由于肠杆菌属细菌本身含有很多产激素和抗菌物质的基因，在保护植物的同时对根部其他内生细菌具有抑制作用。

田间诊断与指示植物鉴定（邹敏和周常勇，2005）、血清学实验（谢钟琛等，2009）、电镜检测（刘利华等，2006）等是初期检测柑橘黄龙病的传统方法，然而这些方法有很多弊端，并会造成检测的不准确（廖祥六等，2007）。随着分子检测技术的提高，常规PCR、Nested-PCR 和 RT-PCR 已经应用到柑橘黄龙病的检测工作中。其中 Nested-PCR 技术在检测灵敏度上远高于常规 PCR（邓明学等，2009），RT-PCR 能够定量地检测柑橘黄龙病病原，这为柑橘黄龙病的检测提供了准确、灵敏的方法（胡浩等，2006）。近年来，Dey 等（2012）建立了一种 STDP（single closed tube dual primer）-Taqman PCR，这种方法将 Nested-PCR 和 RT-PCR 结合起来。

研究采用 Nested-PCR 对柑橘不同部位叶脉进行柑橘黄龙病病原检测，结果表明柑橘黄龙病发病状态的异质性，也即同一株柑橘黄龙病病株在不同器官（叶、茎、根）、不同部位（上、中、下）、不同方位（东、西、南、北）感染黄龙病与否的状态不同，如在病株中部分叶（茎、根）是健康的，部分叶（茎、根）是染毒的；在西面上部、中部叶片及北面下部叶片中可以检测出柑橘黄龙病病原，但其并不会表现出柑橘黄龙病病征，由于黄龙病的潜伏期为 6～18 个月（Lin *et al.*，2007），故有些不表现出黄化症状的叶片中含有黄龙病病原。关于不同部位柑橘叶片黄龙病病原携带状态异质性的研究未见报道。

植物内生菌是植物微生态系统中的重要组成部分，在长期的协同进化中，与植物形成了互惠互利的关系。一方面宿主植物产生的光合产物可为其提供生长所需的营养，另一方面内生菌产生的代谢产物常包含一些促生或抗菌的活性物质，能促进植物的生长发育，提高植物抗逆境、抗胁迫和抗病害的能力（邓明学等，2009）。Clay 和 Holah（1999）发现有内生真菌的草遭受真菌病害影响的程度远低于没有内生菌的。王万能等（2004）从烟草根部分离出能防治烟草黑胫病的内生细菌。石晶盈等（2006）研究发现有些内生菌能产生抗生素类物质，对病菌有拮抗作用。然而柑橘黄龙病病原与柑橘内生细菌之间的相关性还未见报道，本节通过 PCC 分析得出叶片黄龙病病原存在与否与 *Bacillus pumilus* 和 *Bacillus* sp.呈显著负相关，这说明这两种细菌对黄龙病病原菌的存在可能会有抑制作用。其中 *B. pumilus* 已有研究报道可以产生一些生防物质并抑制一些病原菌的生长，Trivedi 等（2011）从柑橘根部分离得到的内生细菌中，有 6 株内生细菌对叶片中黄龙病病原菌的生长有明显的抑制作用。其中内生细菌地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）与研究得到的部分内生细菌同为芽胞杆菌属。

柑橘内生细菌的分布量与其生长环境关系密切，柑橘不同器官其内生细菌分布量不同，根部分布量最大，其次是叶片，枝条分布量最小，与黎起秦等（2006）研究番茄内生菌分布特性的结果一致，他认为番茄根系是内生细菌进入植物的入口，此处有较多植物次生根，机械损伤及病虫危害会造成伤口，因此聚集的内生细菌较多（Zeng *et al.*，2005）。在自然界中微生物与微生物之间存在着复杂的相互关系，植物内生细菌之间的相互关系

也不例外。本节通过 PCC 分析了柑橘不同器官（叶、茎、根）、不同部位（上、中、下）和不同方位（东、西、南、北）的内生细菌之间的相关性，结果发现：在不同器官之间、叶片与枝条相互之间存在显著正相关，而叶片与根部、枝条与根部之间关系不显著；不同部位叶片、枝条之间的内生细菌差异不显著，而不同方位叶片、枝条之间的内生细菌含量差异显著，这可能与柑橘种植朝向的生态因子的差异有关。

有大量研究表明植物内生细菌群落结构与自身生长环境、营养条件、遗传背景有关（何红等，2004）。多样性指数可作为度量微生物群落多样性高低的指标。Maguran（2001）指出 Shannon（H_1）指数反映群落物种多样性，指数越高表明物种的数量越多，且在采样单位中分布越均匀；Simpson（D）指数反映群落中物种的优势度，指数越高表明物种在样品中的集中度越高；Pielou 均匀度指数反映群落物种分布的均匀程度。研究发现柑橘不同器官的内生细菌群落多样性不同，Shannon（H_1）指数最大值出现在叶片，最低在根部，表明柑橘黄龙病植株叶片分布的内生细菌分布量最大，且在各部位（上、中、下及东、西、南、北）分布较均匀，根部内生细菌分布量最少；Simpson（D）指数最大值出现在枝条，最低在根部，表明柑橘黄龙病植株枝条中分离的内生细菌种类最集中，根部内生细菌种类最少；Pielou 指数最大值出现在根部，最低在枝条，表明根部内生细菌分布均匀度最高，枝条内生细菌在各部位（上、中、下及东、西、南、北）分布最不均匀。柑橘内生菌这种分布的异质性对于人们认识柑橘生长的生态环境和黄龙病的发生具有重要意义。

第三节　水稻内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

植物内生细菌长期生活在宿主体内的特殊环境中，并与宿主协同进化，在演化过程中形成了共生的关系，一方面内生细菌可以从宿主吸收营养供自己生长的需要，另一方面内生细菌在宿主的生长发育和系统演化过程中起重要的作用。感染内生细菌的宿主往往具有生长速度快（何红等，2002）、增加产量（傅正擎和郑勤，1999；徐进等，2003），抗逆境（张颖等，2007）、抗病害（傅正擎和郑勤，1999）等优势。植物根际是一个复杂的生态系统，栖息着各种各样的微生物，其中，细菌是这些微生物中的组要组成成员（赵之伟等，1992），细菌的组成及其生命活动对于植物的生长、产量及整个生态系统的物质转化和能量流动均有着重要的作用（Watanabe and Rogor，1984）。研究表明大量的根际有益微生物具有固氮、解磷、产生植物激素等促进植物生长和防治病害的能力，对植物的益处主要表现在，提高根、茎、叶、穗等氮的含量，增加分蘖数、根长、根面积，使孕穗期及开花期提前，增加穗粒数及粒重，提高叶绿素含量及种子萌发率等，提高作物产量等作用。

水稻是世界上最重要的谷类作物之一，是世界上 50%以上人口的粮食之源。目前，水稻产量的提高主要依靠化肥和农药的大面积施用，虽取得一定的效果，但是也产生了极大的环境问题，所以寻找另外一种新的环保的增产途径尤为重要。2006 年，我国学者

报道利用内生菌技术培育出优质高产水稻，所以从微生物角度来研究水稻增产工作将是一个新的方法和新的研究领域。目前，国内外主要是集中于单个内生细菌或根际细菌对水稻的固氮、抗病、促生等作用的研究，而对水稻内生细菌和根际细菌群落结构相关性研究及两者与植物相互作用的研究甚少。研究通过分离不同品种水稻茎部内生细菌和根际土壤细菌，了解它们的群落结构组成，探讨在相同栽培条件下，水稻茎部内生细菌和根际细菌群落结构间的相互关系及其水稻品种特性，试图通过内生细菌或者根际细菌群落结构特点为指标来指示水稻品种特性，从微生态学角度上分析水稻生长特性，为水稻品种特性研究开辟新的思路，同时也为进一步研究和开发利用有益内生细菌和根际细菌资源研究新的方法，为水稻增产工作奠定研究基础。研究方法如下。

二、研究方法

1）供试水稻。水稻由福建省农业科学院水稻研究所提供，水稻品种为：‘航 1 号’，‘航 2 号’，‘Ⅱ优航 1 号’，‘Ⅱ优航 2 号’，‘汕优 63′。

2）田间试验设计和性状调查。试验于 2008 年在福建省农业科学院沙县水稻试验站 2 号田块进行，5 月 16 日播种大棚旱育苗，6 月 26 日插秧。田块面积 2 亩[①]，随机区组设计，重复 3 次，单行区，行长 10m，行距 30cm，穴距 13cm，每穴一棵苗，正常大田管理，生育期间调查抽穗期。9 月 23 日收获，收获时每品种取 10 株，调查其穗数，计算 10 株穗数的平均数，选取与平均数相近的 3 株，风干后进行室内考种，考种项目有株高、穗数、总粒数、结实率等，并计算亩产。

3）采样方法。每品种随机采 3 株，水稻连根带土掘起，把掘出的水稻植株土壤部分用塑料袋严密地包住，并用细线扎好，带回实验室。去除水稻植株根外部土壤，取粘在水稻根际的土样视为根际土，距根部 10～15cm 水稻植株为水稻茎基部。

4）水稻内生细菌分离。采用表面消毒研磨法及平板稀释分离法。称取水稻茎部组织 5g，置于 75%乙醇中浸泡 1min 后，于 0.1%升汞中消毒 2～3min，立即用无菌水漂洗 3 次。将样品移入无菌研钵中，用灭菌剪刀剪碎后加入 10ml 无菌水，充分研磨。静置 20～30min 后，吸取 1ml 进行梯度稀释，涂布平板。

5）水稻根际细菌分离。称取 10g 水稻根际土稀释在 90ml 无菌水中，振荡，稀释为 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}，各取 200μl 稀释液涂布于 NA 平板上，然后将 NA 平板倒置于 30℃暗培养箱中培养 2d，并计数、纯化、保存分离得到的菌株。

6）细菌的脂肪酸鉴定。TSBA 培养基：30g 胰蛋白胨大豆肉汤（tryptic soy broth，TSB）+15g 琼脂+1L 水（TSB 购于 Fisher 公司）。皂化试剂：氢氧化钠 45g+甲醇 150ml+水 150ml。甲基化试剂：6mol/L 盐酸 325ml+甲醇 275ml。萃取试剂：正己烷 200ml+甲基叔丁基乙醚 200ml。洗涤试剂：氢氧化钠 10.8g+水 900ml（配制方法由 MIDI 公司提供）。脂肪酸的提取，①细菌培养条件：TSBA 平板培养基，四线划线法，培养温度（28±1）℃，培养时间（24±2）h。②获菌：用接种环挑取 3～5 环（约 40mg 湿重）的菌落置入一个干净、干燥的有螺旋盖的试管中（最佳的获菌区域为第 3 区）。③皂化：加入（1.0±0.1）ml

① 1 亩≈666.67m²。

皂化试剂，拧紧盖子，振荡 5～10s，放入 95～100℃的沸水中 5min，室温冷却，振荡 5～10s，再水浴 25min，室温冷却。④甲基化：开盖加入（2.0±0.1）ml 甲基化试剂，拧紧盖子，振荡 5～10s，（80±1）℃水浴 10min，移开且快速用流动自来水冷却至室温。⑤萃取：加入（1.25±0.1）ml 的萃取试剂，拧紧盖子，温和混合旋转 10min，打开管盖，利用干净的移液管取出每个样本的下层水相部分。⑥基本洗涤：加入（3.0±0.2）ml 洗涤试剂，拧紧盖子，温和混合旋转 5min，取约 2/3 体积的上层有机相到干净的气相色谱检测小瓶，用于气相检测。脂肪酸的气相色谱检测，在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本：二阶程序升高柱温，170℃起始，5℃/min 升至 260℃，而后 40℃/min 升温至 310℃，维持 90s；汽化室温度 250℃、检测器温度 300℃；载气为氢气（2ml/min）、尾吹气为氮气（30ml/min）；柱前压 10.00psi（1psi=6.895kPa）；进样量 1μl，进样分流比 100∶1。细菌种类鉴定（脂肪酸鉴定法），系统根据各组分保留时间计算等链长（ECL）值确定目标组分的存在，采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量，再将二者与系统谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度指数（similarity index，SI），从而给出一种或几种可能的菌种鉴定结果。一般以最高 SI 的菌种名称作为鉴定结果，但当其报告的几个菌种的 SI 比较接近时，则根据色谱图特征及菌落生长特性进行综合判断。以脂肪酸混合标样校正保留时间。

7）数据处理。内生细菌和根际细菌数量分析采用单因素方差分析（Fisher's LSD test）。以 5 个水稻品种为样本，以内生细菌数量，根际细菌数量和水稻品种特性参数（包括生育期、穗瘟率、最高分蘖数、有效穗、成穗率、穗粒数、结实率、千粒重、亩产、株高）为变量，进行 Pearson 相关分析，所用软件为 SPSS12.0。

三、不同品种水稻根际芽胞杆菌及其细菌总量

实验结果见表 5-27，总体上看，不同品种根际细菌含量和内生细菌含量差异很大，根际细菌的含量远大于内生细菌含量，且水稻品种间根际细菌含量差异很大，其中‘Ⅱ优航 1 号’的根际细菌含量最高，为 25.0×10^{4}CFU/g；其次为品种‘Ⅱ优航 2 号’，根际细菌含量为 25.0×10^{4}CFU/g；接下来依次为：‘汕优 63′、‘航 1 号’、‘航 2 号’，根际细菌含量分别为 16.0×10^{4}CFU/g、12.0×10^{4}CFU/g、11.5×10^{4}CFU/g。品种间内生细菌含量也有差异，含量最高的为品种‘Ⅱ优航 1 号’和‘Ⅱ优航 2 号’，其次为品种‘汕优 63′，接下来为‘航 1 号’和‘航 2 号’。

表 5-27　不同品种水稻茎部内生细菌和根际细菌总量

品种	根际细菌/（×10^{4}CFU/g）	内生细菌/（×10^{4}CFU/g）
航 1 号	12.0±1.73b	0.25±0.09b
航 2 号	11.5±1.26b	0.21±0.06b
Ⅱ优航 1 号	25.5±2.25a	0.67±0.03a
Ⅱ优航 2 号	25.0±4.36a	0.67±0.14a
汕优 63	16.0±1.53b	0.31±0.09b

注：表中数值为平均值±标准误，同一列中不同字母表示在 5%水平上差异显著（Fisher's LSD test）

四、水稻根际内生芽胞杆菌及其细菌脂肪酸鉴定

（1）内生细菌

从水稻茎部分离到的 25 株内生细菌中与 MIDI 数据库比较相似性指数大于 0.500，可确定其菌种名称的有 23 株，属于 13 个种，隶属于 10 属（表 5-28），分别是：芽胞菌属、假单胞菌属、食酸菌属、寡养单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、微杆菌属、不动杆菌属、克雷伯氏菌属、伯克霍尔德菌、肠杆菌属。其中，芽胞杆菌有 4 个种，其余 9 个属包含一个种。同时，芽胞杆菌属为优势菌属，占内生细菌总数的 60.9%。

表 5-28　水稻茎部内生细菌

编号	属名	学名	中文名	相似系数	菌株数
1	芽胞杆菌属	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	0.854	9
2	芽胞杆菌属	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	0.884	2
3	芽胞杆菌属	*Bacillus atrophaeus*	深褐芽胞杆菌	0.765	1
4	芽胞杆菌属	*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌	0.637	2
5	假单胞菌属	*Pseudomonas fluorescens*	荧光假单胞菌	0.532	1
6	食酸菌属	*Acidovorax konjaci*	魔芋食酸菌	0.763	1
7	寡养单胞菌属	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽糖寡养单胞菌	0.649	1
8	鞘氨醇单胞菌属	*Sphingomonas yanoikuyae*	矢野口鞘氨醇单胞菌	0.626	1
9	微杆菌属	*Microbacterium barkeri*	巴氏微杆菌	0.538	1
10	不动杆菌属	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	0.714	1
11	克雷伯氏菌属	*Klebsiella-pneumoniae pneumoniae*	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	0.672	1
12	伯克霍尔德菌	*Burkholderia gladioli*	唐菖蒲伯克霍尔德菌	0.678	1
13	肠杆菌属	*Enterobacter hormaechei*	霍氏肠杆菌	0.656	1

注：微生物自动鉴定系统对细菌的鉴定判别依赖于相似性指数，当相似性指数大于 0.500，说明匹配性很高，为典型种；大于 0.300 小于 0.500，说明匹配性较低，为非典型种；小于 0.300 说明数据库没有此菌种的数据，给出的是最接近的种

（2）根际细菌

根际细菌脂肪酸鉴定结果见表 5-29，分别属于 10 个种，隶属于 8 个属，分别为芽胞杆菌属、假单胞菌属、寡养单胞菌属、光杆菌属、肠杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、金黄杆菌属。其中，芽胞杆菌属为优势菌属，占根际细菌总数的 71.0%。

表 5-29　水稻根际细菌

编码	属	种	中文名	相似系数	菌株数
1	芽胞杆菌属	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	0.837	11
2	芽胞杆菌属	*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌	0.716	5
3	芽胞杆菌属	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌	0.793	4
4	芽胞杆菌属	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	0.806	2
5	假单胞菌属	*Pseudomonas fluorescens*	荧光假单胞菌	0.532	2
6	寡养单胞菌属	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽糖寡养单胞菌	0.529	3

续表

编码	属	种	中文名	相似系数	菌株数
7	光杆菌属	*Photorhabdus luminescens*	发光光状杆菌	0.518	1
8	肠杆菌属	*Enterobacter cloacae*	阴沟肠杆菌	0.664	1
9	鞘氨醇单胞菌	*Sphingomonas yanoikuyae*	矢野口鞘氨醇单胞菌	0.626	1
10	金黄杆菌属	*Chryseobacterium indologenes*	产吲哚金黄杆菌	0.693	1

注：微生物自动鉴定系统对细菌的鉴定判别依赖于相似性指数，当相似性指数大于 0.500，说明匹配性很高，为典型种；大于 0.300 小于 0.500，说明匹配性较低，为非典型种；小于 0.300 说明数据库没有此菌种的数据，给出的是最接近的种

五、水稻茎部和根际内生芽胞杆菌与水稻品种特性的相关性

为了深入分析水稻茎部内生细菌和根际细菌相互关系及其与水稻品种特性的影响，对表 5-30 中水稻各品种特征参数（包括生育期、穗瘟率、最高分蘖数、有效穗、成穗率、穗粒数、结实率、千粒重、亩产、株高）与内生细菌数量和根际细菌数量进行 Pearson 相关分析。结果见表 5-31，从表 5-31 中可以得到水稻茎部内生细菌和根际细菌与水稻有效穗存在负相关，与穗粒数存在正相关，与结实率、千粒重、理论亩产存在极显著正相关，但与水稻的株高、生育期、穗瘟相关不显著。

表 5-30　水稻品种特性

品种	全生育期 /d	穗瘟率 /%	最高分蘖数 /个	有效穗 /粒	成穗率 /%	穗粒数 /个	结实率 /%	千粒重 /g	亩产 /kg	株高 /cm
航 1 号	133.67	31.16	12.13	8.91	73.44	122.29	78.52	28.11	485.44	117.67
航 2 号	133.67	7.66	14.40	9.30	64.49	126.63	76.81	28.23	519.93	116.67
II 优航 1 号	130.67	84.26	14.03	8.30	59.51	127.55	83.28	29.22	564.80	114.00
II 优航 2 号	130.67	14.21	12.27	8.40	68.34	139.54	83.89	29.17	563.54	115.67
汕优 63	128.67	30.32	13.70	9.28	67.99	112.57	79.18	28.43	495.06	100.00

表 5-31　水稻茎部内生细菌和根际细菌与水稻生物学特性间的相关系数

微生物类群	生物学特征									
	全生育期	稻瘟率	最高分蘖数	有效穗	成穗率	穗粒数	结实率	千粒重	亩产	株高
内生细菌	−0.462	0.517	−0.164	−0.931*	−0.465	0.641	0.987**	0.986**	0.894*	0.122
根际细菌	−0.564	0.526	−0.094	−0.881*	−0.504	0.567	0.980**	0.993**	0.880*	0.002

注：Pearson 相关分析，* 和** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上相关显著（双侧检验）

六、讨论

Fisher 等（1992）认为在植物内生微环境中，不同的微生物相互作用，并建立一种平衡，从而形成一种相对稳定的细菌菌群。从分离出的内生细菌来看，有些菌的分离率较高，为优势菌，如芽胞杆菌属，而有些菌相反，为稀有属。本试验中分离到的水稻内

生优势菌为蜡状芽胞杆菌，与刘云霞等（1999）从水稻（‘沈农 319’，‘中百 4 号’）分离到的优势菌为巨大芽胞杆菌和杨海莲等（1999）从水稻（‘越富’）分离得到的优势菌为成团肠杆菌 *Enterobacter agglomerans* 不同。由于水稻品种、生长环境、土壤营养条件不同，水稻植株内生环境中优势菌群不同，这种群落结构的差异性是内生菌与水稻共同进化形成的，是水稻的遗传性、生理、代谢产物与微生物的营养要求和生理代谢等相互适应的结果。

同时比较内生细菌和根际细菌可以看出，从水稻茎部中分离到的内生细菌有很大一部分在根际微环境中也存在，但有的根际细菌在植物体内又不一定有，说明内生细菌和根际细菌之间存在一定的联系。罗明等（2007）从棉花的根部和茎部分离出的内生细菌，其大部分分类单位与土壤常见的细菌相同，且根中细菌数量大于茎中的细菌数量。现在大量研究认为内生细菌起源于根际，并由此进入植物组织内（Quadt-Hallmann *et al.*，1997）；且发现这些内生细菌主要为兼性内生的土壤性细菌，最常见的优势种群有假单胞菌属、芽胞杆菌属、肠杆菌属、土壤杆菌属（*Agrobacterium*）（Zou and Tan，1999）。因此内生细菌是否是植物根际细菌在与植物长期适应过程中有选择性地进入到植物体内值得进一步探究。

另外，大量研究表明内生菌群落结构与植株品种，自身生长环境、营养条件、遗传背景有关（罗明等，2004；高增贵等，2006）。本实验通过相关分析得到水稻内生细菌和根际细菌与水稻生物学参数有效穗呈负相关，而与穗粒数、结实率都存在正相关，说明内生细菌和根际细菌在水稻生长发育过程中，尤其是产量形成上都起了非常重要的正效益，虽然大量资料表明内生细菌和根际有益细菌有促进水稻根系分泌有机物合成、提高叶片光合效率、促进水稻生长、提高水稻产量等作用，但在水稻生长过程中，水稻内生细菌和根际细菌如何调节水稻生长机制的，目前还不是很清楚，水稻生长机制调节是多种类群微生物作用的结果还是单个微生物起作用也值得深入研究，另外，这种调节机制是否与水稻生育期有关等问题，也值得进一步研究。

第四节　茄子内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

植物内生菌是一个生态学概念（文才艺等，2004），在宿主的影响下，内生菌的不同亚群会在不同的环境中形成，当宿主植物在环境恶化的情况下，它会选择侵染那些增强其抵抗恶劣环境的内生菌亚群（Steven *et al.*，2001）。因此，不同生长环境、不同生长状态下的植株，其内生菌的种类、群落特性会存在差异，这些差异在某种程度上反映了其外部环境的变化特性。目前对植物内生菌的研究应用主要集中在内生菌的分离、鉴定及病害防治、促生因子等方面（Ravel *et al.*，1997；何红等，2004a；傅正擎和郑勤，1999），研究表明，植物内生菌对宿主植物有广泛的益生作用，如固氮作用、促进植物合成多种生长激素（Kiwamu *et al.*，2004）、促进宿主根系生长和对多种无机离子的吸收（Okon and Itzigsohn，1995），这些生物学功能都是在植物内生菌复杂的群落结构条

件下实现的，因而，了解植物内生细菌的群落结构多样性，对于研究内生细菌的作用机制、更加有效地利用内生细菌资源等具有重要意义。本研究通过分离不同来源地点、不同生长状态的茄子植株内生细菌，了解内生细菌群落结构的多态性。通过气相色谱技术快速、灵敏、准确地检出内生细菌的脂肪酸，利用全自动微生物鉴定系统进行鉴定，从而明确茄子植株内生细菌菌群的组成、菌群密度的分布特点及种植地区、不同部位、植株的健康状态对内生细菌分布的影响，了解植物内生细菌与植物病原菌间的消长关系，为内生细菌资源的进一步研究和开发利用奠定基础。该研究对于通过微生物标记植物生长的生态环境具有重要的实验意义，对于科学说明生防机理具有重要作用。研究方法如下。

二、研究方法

1）材料。茄子品种为‘早丰红茄’，采集时间为 2007 年 6 月 27 日，生长阶段为结果期；采集地点为福州福清、泉州晋江和莆田东洋镇。每个采样地点选择茄子种植地 1 亩，随机采集茄子健株 5 株，青枯病病株 5 株。普通细菌分离用 NA 培养基，青枯雷尔氏菌分离用 TTC 培养基，细菌的保存用 LB 培养基。脂肪酸提取处理试剂的配制方法由 MIDI 公司提供。气相色谱系统为美国 Agilent 6890N 型，包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器。分析软件为美国 MIDI 公司开发的基于微生物细胞脂肪酸成分鉴定的全自动微生物鉴定系统 Sherlock MIS4.5 和 LGS4.5。

2）内生细菌及青枯雷尔氏菌的分离。采用表面消毒研磨法及平板稀释分离法。将茄子植株样本分成根、茎基、茎中、茎顶、叶 5 个部位，每个部位分别称取 5g，将 5 个植株的各部位称取样本分别混合，置于 75%乙醇中浸泡 1min 后，于 0.1%升汞中消毒 2～3min，立即用无菌水漂洗 3 次。将样品移入无菌研钵中，用灭菌剪刀剪碎后加入 10ml 无菌水，充分研磨。静置 20～30min 后，吸取 1ml 进行梯度稀释，涂布平板，平板置于 30℃恒温培养箱暗培养约 48h 后取出，进行统计。挑取单菌落并进行纯化培养，LB 斜面 30℃培养 48h 后于 4℃冰箱保存备用。

3）细菌的脂肪酸鉴定。细菌的脂肪酸提取和鉴定方法参见第五章第三节。

4）茄子植株内生菌群落结构多样性分析。将内生细菌的种类作为数量测度，引入生态学多样性测度 Shannon-Wiener（H_1）、Pielou 均匀度（J）、Simpson 优势度指数（D）等方法，分析内生细菌的群落结构特性。

三、茄子内生芽胞杆菌及其细菌数量分布

对泉州晋江、莆田东洋镇、福州福清等地采集茄子健康植株进行内生细菌的分离，健康植株内生细菌含量为 5.96×10^5CFU/g，其中根、茎和叶片内生细菌的含量分别为 1.54×10^5CFU/g、3.99×10^5CFU/g 和 0.42×10^5CFU/g。茄子植株内生细菌的种类结果见表 5-32。依据文献及 MIDI 全自动微生物鉴定系统鉴定结果，共分离到 18 属 28 种细菌。其中，不动杆菌属（*Acinetobacter*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、和微杆菌属（*Microbacterium*）均有 3 个种，假单胞菌属（*Pseudomonas*）和耶尔森菌属（*Yersinia*）均包含 2 个种，其余 12 个属均包含 1 个种。

表 5-32　茄子植株内生细菌

编号	属	种名	中文种名	相似系数*
1	无色菌属	*Achromobacter pasteurianus*	无色菌属（无中文名）	0.532
2	不动杆菌属	*Acinetobacter baumannii*	鲍氏不动杆菌	0.576
		Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	0.562
		Acinetobacter haemolyticus	鲍曼溶血不动杆菌	0.648
3	芽胞杆菌属	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	0.807
		Bacillus megatherium	巨大芽胞杆菌	0.859
		Bacillus pumilus	短小芽胞杆菌	0.589
4	慢生根瘤菌属	*Bradyrhizobium japonicum*	大豆慢生根瘤菌	0.906
5	黄杆菌属	*Chryseobacterium indologenes*	吲哚黄杆菌	0.618
6	肠杆菌属	*Enterobacter asburiae*	阿斯布肠杆菌	0.751
		Enterobacter cancerogenus	生癌肠杆菌	0.737
		Enterobacter hormaechei	霍氏肠杆菌	0.881
7	克吕沃尔菌属	*Kluyvera cryocrescens*	栖冷克吕沃尔氏菌	0.716
8	微杆菌属	*Microbacterium barkeri*	微杆菌属（无中文名）	0.769
		Microbacterium chocolatum	微杆菌属（无中文名）	0.630
		Microbacterium liquefaciens	微杆菌属（无中文名）	0.747
9	泛菌属	*Pantoea agglomerans*	成团泛菌	0.524
10	发光杆菌属	*Photorhabdus indologenes*	发光杆菌属（无中文名）	0.574
11	假单胞菌属	*Pseudomonas chlororaphis*	绿针假单胞菌	0.824
		Pseudomonas putida	恶臭假单胞菌	0.669
12	青枯雷尔氏菌属	*Ralstonia solanacearum*	青枯雷尔氏菌	0.687
13	根瘤菌属	*Rhizobium radiobacter*	放射型根瘤菌	0.851
14	红球菌属	*Rhodococcus erythropolis*	红串红球菌	0.914
15	沙门菌属	*Salmonella typhimurium*	鼠伤寒沙门氏菌	0.529
16	鞘脂菌属	*Sphingobium yanoikuyae*	鞘脂菌属（无中文名）	0.755
17	窄食单胞菌属	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽糖窄食单胞菌	0.977
18	耶尔森菌属	*Yersinia aldovae*	阿氏耶尔森菌	0.622
		Yersinia frederiksenii	费氏耶尔森菌	0.504

*表示微生物自动鉴定系统对细菌的鉴定判别依赖于相似性指数，当相似性指数大于 0.500，说明匹配性很高，为典型种；大于 0.300 小于 0.500，说明匹配性较低，为非典型种；小于 0.300 说明数据库没有此菌种的数据，给出的是最接近的种

四、植株不同部位内生芽胞杆菌及其细菌种群分布

茄子植株不同部位内生细菌的分布情况统计结果见表 5-33。不同地点采集的茄子植株不同部位分离到的内生细菌种类存在较大的差异，总体来看，以根部分离到的内生细菌种类最多，其次是茎部，叶部分离到的种类最少，健株的根部、茎部和叶部分离到内生细菌分别为 12 属 16 种、11 属 15 种和 3 属 3 种，而病株的分别为 10 属 11 种、8 属 9

种和 3 属 3 种。

表 5-33　茄子植株不同部位内生细菌的种类

编号	种名	根						茎						叶					
		泉州		莆田		福州		泉州		莆田		福州		泉州		莆田		福州	
		健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株
1	*Achromobacter pasteurianus*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	*Acinetobacter baumannii*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	*Acinetobacter calcoaceticus*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	*Acinetobacter haemolyticus*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	*Bacillus cereus*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	*Bacillus megatherium*	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7	*Bacillus pumilus*	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	*Bradyrhizobium japonicum*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	*Chryseobacterium indologenes*	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	*Enterobacter asburiae*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	*Enterobacter cancerogenus*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	*Enterobacter hormaechei*	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	*Kluyvera cryocrescens*	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14	*Microbacterium barkeri*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	*Microbacterium chocolatum*	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
16	*Microbacterium liquefaciens*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	*Pantoea agglomerans*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

续表

编号	种名	根						茎						叶					
		泉州		莆田		福州		泉州		莆田		福州		泉州		莆田		福州	
		健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株	健株	病株
18	*Photorhabdus indologenes*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19	*Pseudomonas chlororaphis*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	*Pseudomonas putida*	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
21	*Ralstonia solanacearum*	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
22	*Rhizobium radiobacter*	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	*Rhodococcus erythropolis*	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
24	*Salmonella typhimurium*	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	*Sphingobium yanoikuyae*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	*Stenotrophomonas maltophilia*	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
27	*Yersinia ldovae*	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	*Yersinia frederiksenii*	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注：1 表示存在；0 表示不存在

以分离到的 28 个菌株为样本，以各菌株在各部位出现与否为指标，用类平均法对数据进行系统聚类分析，结果见表 5-34 和图 5-5。当 λ=0.69 时，可将 28 株内生细菌分为 6 个类群。类群Ⅰ包括 7 个菌种，分别是第一株 *Achromobacter pasteurianus*、第 2 株 *Acinetobacter baumannii*、第 8 株 *Bradyrhizobium japonicum*、第 11 株 *Enterobacter cancerogenus*、第 14 株 *Microbacterium barkeri*、第 27 株 *Yersinia aldovae* 和第 24 株 *Salmonella typhimurium*，它们的共同特征是均分离自泉州健株样本的茎部。类群Ⅱ包括 2 个菌种，分别是第 4 株 *Acinetobacter haemolyticus* 和第 19 株 *Pseudomonas chlororaphis*，仅存在于泉州病株样本的根部。类群Ⅲ包括 9 个菌种，分别是第 6 株 *B. megatherium*、第 13 株 *Kluyvera cryocrescens*、第 12 株 *Enterobacter hormaechei*、第 22 株 *Rhizobium radiobacter*、第 7 株 *B. pumilus*、第 28 株 *Yersinia frederiksenii*、第 26 株 *Stenotrophomonas maltophilia*、第 10 株 *Enterobacter asburiae* 和第 18 株 *Photorhabdus indologenes*，其共同特征是在莆田健株样本的根部均存在。类群Ⅳ包括 3 个菌种，第 20 株 *P. putida*、第 23

株 *Rhodococcus erythropolis* 和第 21 株 *Ralstonia solanacearum*，共同特征是均存在于泉州病株样本的茎部。类群Ⅴ包括 4 个菌种，其中有第 9 株 *Chryseobacterium indologenes*、第 16 株 *Microbacterium liquefaciens*、第 25 株 *Sphingobium yanoikuyae* 和第 15 株 *Microbacterium chocolatum*，在泉州健株样本的根部均存在。类群Ⅵ包括 3 个菌种，分别是第 3 株 *Acinetobacter calcoaceticus*、第 17 株 *Pantoea agglomerans* 和第 5 株 *B. cereus*，均存在于福州健株样本的根部。

表 5-34　聚类过程

T	*J*	*I*	距离
1	1	2	0.0000
2	1	8	0.0000
3	1	11	0.0000
4	1	14	0.0000
5	4	19	0.0000
6	16	25	0.0000
7	1	27	0.0000
8	6	13	0.1429
9	3	17	0.2000
10	7	28	0.2500
11	6	12	0.2667
12	9	16	0.3333
13	10	18	0.3333
14	1	24	0.3333
15	6	22	0.3396
16	6	7	0.3969
17	3	5	0.4167
18	6	26	0.4427
19	20	23	0.5000
20	9	15	0.5333
21	20	21	0.6364
22	6	10	0.6862
23	6	20	0.8017
24	6	9	0.8442
25	1	4	0.9048
26	1	6	0.9311
27	1	3	0.9978

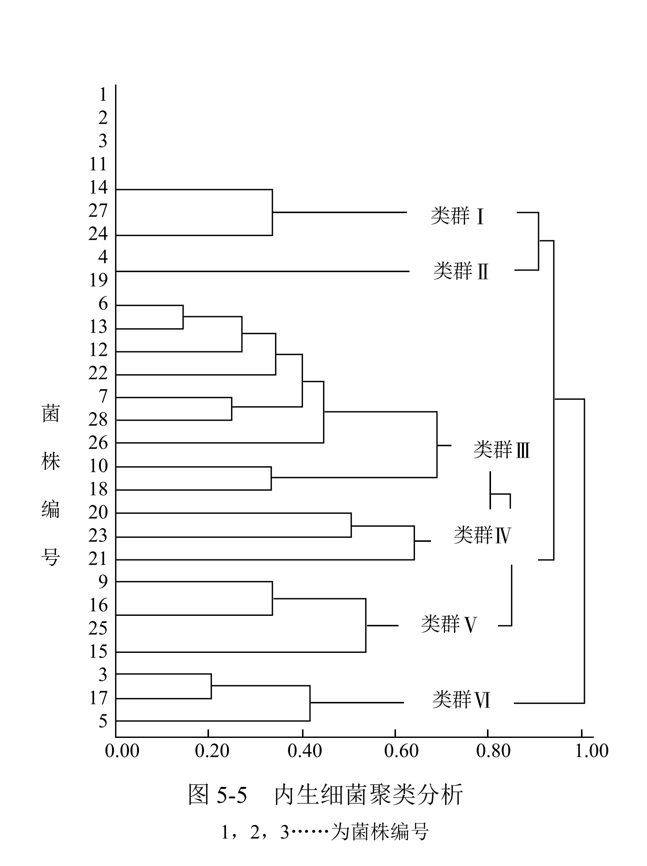


图 5-5　内生细菌聚类分析

1，2，3……为菌株编号

五、健株与病株内生芽胞杆菌及其细菌种群多样性

实验结果见表 5-35。茄子健株和病株内生细菌含量和群落结构均存在较大的差异。健康的茄子植株分离到内生细菌共 15 属 23 种，含量为 5.96×10^5CFU/g，其中青枯雷尔氏菌（*Ralsotina solanacearum*）含量为 0；青枯病植株共分离得到内生细菌 14 属 15 种，含

量为 3.191×10^{8}CFU/g，其中青枯雷尔氏菌含量为 3.187×10^{8}CFU/g，占总含量的 99.87%，而其余 14 种细菌含量仅为 4.06×10^{5}CFU/g。健株与病株非植物病原内生细菌的数量相近，但是种类不同。以茄子植株不同生长状态分离到的 28 个菌株为样本，以各菌株在病株、健株体内分布量为指标，数据标准化转化，采用离差平方和法进行系统聚类分析，结果见表 5-36 和图 5-6。

表 5-35　茄子植株不同生长状态内生细菌的种类　（单位：×10^{5}CFU/g）

编号	内生菌种名	健康植株数量	青枯病病株数量
1	*Achromobacter pasteurianus*	0.02	0.00
2	*Acinetobacter baumannii*	0.32	0.00
3	*Acinetobacter calcoaceticus*	1.42	0.00
4	*Acinetobacter haemolyticus*	0.00	0.32
5	*Bacillus cereus*	0.12	0.00
6	*Bacillus megatherium*	0.14	0.12
7	*Bacillus pumilus*	0.03	0.01
8	*Bradyrhizobium japonicum*	0.16	0.00
9	*Chryseobacterium indologenes*	0.01	0.01
10	*Enterobacter asburiae*	0.05	0.00
11	*Enterobacter cancerogenus*	0.11	0.00
12	*Enterobacter hormaechei*	0.25	0.06
13	*Kluyvera cryocrescens*	0.76	0.11
14	*Microbacterium barkeri*	0.21	0.00
15	*Microbacterium chocolatum*	0.06	0.21
16	*Microbacterium liquefaciens*	0.33	0.00
17	*Pantoea agglomerans*	0.61	0.57
18	*Photorhabdus indologenes*	0.28	0.00
19	*Pseudomonas chlororaphis*	0.00	0.18
20	*Pseudomonas putida*	0.00	0.03
21	*Ralstonia solanacearum*	0.00	3186.86
22	*Rhizobium radiobacter*	0.05	0.16
23	*Rhodococcus erythropolis*	0.00	1.01
24	*Salmonella typhimurium*	0.08	0.21
25	*Sphingobium yanoikuyae*	0.16	0.00
26	*Stenotrophomonas maltophilia*	0.02	1.06
27	*Yersinia aldovae*	0.02	0.00
28	*Yersinia frederiksenii*	0.75	0.00
	合计	5.96	3190.92

表 5-36　聚类过程

T	I	J	距离
1	9	7	0
2	19	18	0
3	2	1	0.000 12
4	12	11	0.000 13
5	3	1	0.000 2
6	5	1	0.000 96
7	8	7	0.001 17
8	27	26	0.008 52
9	24	23	0.010 99
10	16	15	0.013 37
11	13	11	0.019 15
12	10	7	0.022 23
13	6	1	0.024 49
14	18	17	0.034 26
15	22	21	0.034 54
16	14	11	0.051 77
17	21	20	0.074 56
18	17	15	0.098 08
19	7	1	0.114 55
20	23	20	0.162 28
21	26	25	0.166 62
22	11	1	0.297 64
23	20	15	0.619 57
24	28	25	0.747 52
25	15	1	1.81 68
26	25	4	2.749 39
27	4	1	3.739 03

图 5-6　内生细菌聚类分析

1，2，3……为菌株编号

当 λ=1.50 时，可将 28 株内生细菌分为 4 个类群。类群Ⅰ包括 13 个菌种，分别是第 4 株 *Acinetobacter haemolyticus*、第 19 株 *Pseudomonas chlororaphis*、第 20 株 *P. putida*、第 23 株 *Rhodococcus erythropolis*、第 9 株 *C. indologenes*、第 1 株 *Achromobacter pasteurianus*、第 26 株 *Stenotrophomonas maltophilia*、第 27 株 *Y. aldovae*、第 7 株 *B. pumilus*、第 10 株 *Enterobacter asburiae*、第 22 株 *Rhizobium radiobacter*、第 15 株 *M. chocolatum*、第 24 株 *Salmonella typhimurium*。它们的共同特征是在健株中的含量低于 0.1×10^5CFU/g。类群Ⅱ共包括 10 个菌种，分别是第 1 株 *E. cancerogenus*、第 5 株 *B. cereus*、第 6 株 *B. megatherium*、第 8 株 *B. japonicum*、第 25 株 *Sphingobium yanoikuyae*、第 14 株 *M. barkeri*、

第 12 株 *Enterobacter hormaechei*、第 18 株 *Photorhabdus indologenes*、第 2 株 *Acinetobacter baumannii*、第 16 株 *M. liquefaciens*，在健株中的含量均大于 0.20×10^5CFU/g，小于 0.30×10^5CFU/g；在病株中含量很低或未见分布。类群Ⅲ仅包括第 21 株 *Ralstonia solanacearum*，仅在病株中存在。类群Ⅳ包括第 17 株 *Pantoea agglomerans*、第 28 株 *Yersinia frederiksenii*、第 13 株 *Kluyvera cryocrescens*、第 3 株 *A. calcoaceticus*，在健株中分布的含量高于 0.60×10^5CFU/g。

六、不同生长地区茄子植株内生芽胞杆菌及其细菌种群多样性

不同地区茄子健株内生细菌的种类见表 5-37。不同种植地来源的茄子植株内生细菌的种类有所差异。健株中共分离 15 属 23 种，其中来自晋江的健株分离到 13 属 17 种，来自东洋的健株分离到 7 属 9 种，而来自福清的健株仅分离到 3 属 4 种。慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）、黄杆菌属（*Chryseobacterium*）和鞘脂菌属（*Sphingobium*）仅存在于来自晋江的植株，发光杆菌属（*Photorhabdus*）仅存在于来自东洋的植株，而泛菌属（*Pantoea*）仅存在于来自福清的植株。来自晋江的植株内生细菌的 Simpson（*D*）优势

表 5-37　不同地区茄子健株内生细菌种类及其生态指数

编号	属	来源		
		晋江	东洋	福清
1	*Achromobacter*	1	0	0
2	*Acinetobacter*	1	0	1
3	*Bacillus*	2	2	2
4	*Bradyrhizobium*	1	0	0
5	*Chryseobacterium*	1	0	0
6	*Enterobacter*	1	2	0
7	*Kluyvera*	1	1	0
8	*Microbacterium*	3	0	0
9	*Pantoea*	0	0	1
10	*Photorhabdus*	0	1	0
11	*Rhizobium*	1	1	0
12	*Salmonella*	1	0	0
13	*Sphingobium*	1	0	0
14	*Stenotrophomonas*	1	1	0
15	*Yersinia*	2	1	0
16	属（*S*）	13	7	3
17	种（*N*）	17	9	4
18	优势度指数 Simpson（*D*）	0.9632	0.9444	0.8333
19	多样性指数 Shannon（H_1）	3.5725	2.7255	1.5
20	均匀度（*J*）	0.9654	0.9708	0.9464

度指数和 Shannon（H_1）多样性指数分别为 0.9632 和 3.5725，均高于来自东洋的植株内生细菌的 0.9444 和 2.7255，来自福清植株的 0.8333 和 1.5。而均匀度则以来自东洋的植株最高为 0.9708，来自晋江和福清的植株分别为 0.9654 和 0.9464。

七、讨论

有关植物内生细菌的研究据不完全资料统计，已从近 30 种植物分离到近 60 个属的内生细菌（Kobayashiand Palumbo，2000），涉及的植物主要有小麦、水稻、棉花、花生、马铃薯、番茄、烟草等（王刚和李志强，2005；沈德龙等，2002；罗明等，2004；宋子红等，1999；黎起秦等，2004；周婧等，2008；付业勤等，2007；孙义等，2008；Angela *et al.*，2004； 彭细桥等，2007）。对于植物内生细菌的鉴定，长期以来采用分离、培养鉴定的方法，近年来，借助土壤微生物的研究手段，将分子生物学的方法应用到植物内生细菌的研究中，如利用 16S rDNA-PCR-DGGE 技术结合传统培养方法检测马铃薯内生细菌种群（Berg *et al.*，2005）。利用 16S rDNA-TRFLP 技术发现马铃薯植株内定殖有多个系统发育分支的内生细菌种群（Sessitsch *et al.*，2004；Birgit *et al.*，2002）。

脂肪酸是微生物细胞中的一种重要的成分，迄今为止已经在细菌中发现了 300 多种脂肪酸，不同菌种的脂肪酸在组成和含量上有较大差异，它和细菌的遗传变异、耐药性等有极为密切的关系（Welch，1991；刘志辉等，2005），利用脂肪酸鉴定细菌已经有很多研究，目前这项技术已经广泛用于细菌的鉴定和多样性研究中（吴愉萍等，2006）。微生物自动鉴定系统对细菌的鉴定判别依赖于相似性指数，当相似性指数大于 0.500，说明匹配性很高，为典型种；大于 0.300 小于 0.500，说明匹配性较低，为非典型种；小于 0.300，说明数据库没有此菌种的数据，给出的是最接近的种。研究采用相似性指数高于 0.5 的细菌鉴定的结果，能可靠地反映细菌鉴定的种类。

研究采用常规分离法，通过脂肪酸鉴定技术，分离鉴定茄子植株内生细菌，共得到 18 属 28 种细菌。其中假单胞菌属（*Pseudomons*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）为最常见属，已从许多植物中分离到，包含许多作为生防因子开发的菌株，展现了植物内生细菌广阔的开发前景。

微杆菌属（*Microbacterium*）（Denise *et al.*，2002）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）（Rasche *et al.*，2009）、根瘤菌属（*Rhizobium*）（潘佩平和周鸿宾，1995）、慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）（戴美学等，2003）、泛菌属（*Pantoea*）（Siva and Gwyn，2003），这些细菌作为内生菌已经从不同的植物中分离到，且对它们的生物学特性都已有不同程度的研究。研究分离获得的其他属的细菌均有相应的研究文献，且有些已经进行较为详细深入的研究，如黄杆菌属（*Chryseobacterium*）（Antonio *et al.*，2005）、无色菌属（*Achromobacter*）（William and George，1968）、克吕沃尔菌属（*Kluyvera*）（Luttrell *et al.*，1988）、发光杆菌属（*Photorhabdus*）（Cabral *et al.*，2004）、红球菌属（*Rhodococcus*）（Werf *et al.*，1999）、寒沙门氏菌属（*Salmonella*）（Bernardo *et al.*，2000）、窄食单胞菌属（*Stenotrophomonas*）（Wolf *et al.*，2002）、耶尔森菌属（*Yersinia*）（Bercovier *et al.*，1980； Steven *et al.*，2006）、鞘脂菌属（*Sphingobium*）（Daisuke *et al.*，2008）等。但这些细菌多来自土壤、水体，有些还是人体的病原菌，如克吕沃尔菌属。研究在

茄子植株中分离获得这些细菌，采用脂肪酸特性鉴定的方法进行了鉴定，作为植物内生细菌尚未见相关的文献报道，其内生定殖特性尚需进一步研究。

植物内生菌的分布与群落结构不仅与植物的种类、基因型有关，还与植物的生长阶段、环境条件有关，存在复杂的多样性。一般来说，生物多样性是衡量生态系统稳定和健康的一个重要指标（Bertollo，2001），适宜的生长环境，其多样性高，优势度低，均匀度高。马铃薯内生细菌的群落结构与病原菌的存在和消失密切相关，受 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 侵染的马铃薯病株内生细菌的群落多样性要高于健康植株（Birgit *et al.*，2002）。而本研究结果与之正好相反，健株内生细菌的种类为 15 属 23 种，多于病株的 14 属 15 种。根据采集地、生长状态和分离部位不同，可以将 28 株细菌分为 6 个类群；根部分离的种类最多，其次为茎部，叶部分离的种类最少。从内生细菌的含量来看，健康的茄子植株分离到内生细菌含量为 5.96×10^5CFU/g。而青枯病植株内生细菌的含量为 3.191×10^8CFU/g，远高于健康植株内生细菌等含量，其中青枯雷尔氏菌含量高达 3.187×10^8CFU/g，而其余 14 种内生细菌含量仅为 4.06×10^5CFU/g。产生这些差异的原因可能是由于取样状态的不同，研究的病株已完全表现青枯病病状，病株体内的内生细菌已占据了数量上的绝对优势，从而导致了病株内生细菌多样性的下降。

从不同来源地植株内生细菌的群落结构特性来看，来自晋江植株内生细菌的 Simpson（D）优势度指数和 Shannon（H_1）多样性指数均高于来自东洋的植株和来自福清的植株。而均匀度则以来自东洋的植株最高。因此，植株的内生细菌群落结构是受到植株生长环境、生长状态影响的，或者说，植株体内某些特殊的内生细菌群落结构特性可能表征植株的生长环境或状态。利用分离培养的方法对茄子植株的内生细菌群落结构进行了研究，尚不能全面阐明内生细菌的群落结构特性，有关这些内生细菌在植株生长过程中的作用如何，它们之间的相互作用是什么，如何影响植株代谢，如何进入植株等，都有待进一步研究阐明。

第五节　香蕉内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

植物内生细菌具有宿主特异性，而且在同一宿主的不同器官、生育期及宿主所处环境的不同，其类群结构各有不同（Steven *et al.*，2001）。研究表明植物内生细菌生防机制主要有产生抗生素、竞争生态位和营养、诱导寄主产生系统抗性、灭活病菌萌发因子、产生胞外酶溶解病原菌细胞壁和降解毒素等几种方式（Mocali *et al.*，2003）。这些生物学功能都是在植物内生菌复杂的群落结构条件下实现的，因而，了解植物内生细菌的群落结构多样性，对于研究内生细菌的作用机制、更加有效地利用内生细菌资源等具有重要意义。研究通过分离不同生长状态的香蕉植株内生细菌，了解内生细菌群落结构的多态性。拟通过气相色谱技术快速、灵敏、准确地检出内生细菌的脂肪酸，利用全自动微生物鉴定系统进行鉴定，从而明确香蕉植株内生细菌菌群的组成，为香蕉内生细菌资源

的进一步研究和开发利用提供基础。试验方法如下。

二、研究方法

1）试验材料。香蕉（*Musa paradisiaca*）健株一株，病株一株；均处于成果期。采集地点为福建漳州。采集时间为 2007 年 6 月 27 日。

2）内生细菌的分离与纯化。将香蕉植株分为根、茎、叶三部分。根部分别选取根尖和根基部分；假茎部则根据根长度从茎基部到茎顶端等分为 5 段，每段随机取样；叶片根据生长的位置分为上部、中部和下部叶片，每部分取叶基部、中部和叶尖部分。将样本用自来水冲洗干净，吸水滤纸吸干水分，称重，先用 75%乙醇浸泡 40s 左右，用无菌水充分淋洗，再用 10% $KClO_3$ 溶液浸 8min，无菌水反复淋洗。在无菌研钵中充分研磨匀浆，无菌水梯度稀释，取 200μl 稀释液涂布于 NA 平板上，每梯度 3 个重复，静置 20min 后，30℃倒置暗培养 24～48h。统计菌落种类和数量。分别计数后用−80℃甘油冷冻保存待用。以组织消毒后用无菌水淋洗的淋洗液作为对照，涂 NA 平板培养，如长菌落，则判定研磨液所培养的菌落为非内生菌，丢弃；若对照中无菌落，则基本可判定在研磨液中长出的菌落可能是内生菌，纯化，保存待用。

3）细菌的脂肪酸鉴定。细菌的脂肪酸提取和鉴定参见第五章第三节。

三、香蕉植株内生芽胞杆菌及其细菌分离和鉴定

分离香蕉植株内生细菌种类见表 5-38。香蕉植株共分离获得 21 属 24 株内生细菌。其中肠杆菌属、泛菌属和微杆菌属各有两株，其余 18 个属各有一株。

表 5-38 香蕉健株和病株内生细菌脂肪酸鉴定结果

植株	部位	属	菌株		种
健株	根、茎	摩根氏菌属	1	*Morganella morganii*	摩氏摩根菌
	根、茎、叶	窄食单胞菌属	1	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽窄食单胞菌
	根、叶	棒杆菌属	1	*Corynebacteriu matruchotii*	马氏棒杆菌
		白喉棒杆菌属	1	*Diphtheria intermedius*	中间白喉棒杆菌
		埃希氏菌属	1	*Escherichia coli*	大肠杆菌
		微杆菌属	1	*Microbacterium liquefaciens*	液化微杆菌
	叶	短波单胞菌属	1	*Brevundimonas vesicularis*	泡囊短波单胞菌
		肠杆菌属	1	*Enterobacter aerogenes*	产气肠杆菌
		库特氏菌属	1	*Kurthia sibirica*	西伯利亚库特氏菌
病株	根	沙门氏菌属	1	*Salmonella typhimurium*	鼠伤寒沙门氏菌
	根、叶	肠杆菌属	1	*Enterobacter cloacae*	阴沟肠杆菌
		弧菌属	1	*Vibrio hollisae*	霍氏弧菌
	茎、叶	嗜冷杆菌属	1	*Psychrobacter phenylpyruvicus*	苯丙酮酸冷杆菌

续表

植株	部位	属		菌株	种
病株	茎	醋杆菌属	1	*Acetobacter aceti*	醋酸醋杆菌
		黄杆菌属	1	*Chryseobacterium balustinum*	大比目鱼黄杆菌
	茎	肠杆菌属	1	*Enterobacter aerogenes*	产气肠杆菌
		乳酸菌属	1	*Lactobacillus acetotoleran*	乳酸菌属
		微杆菌属	1	*Microbacterium chocolatum*	巧克力微杆菌
		泛菌属	2	*Pantoea agglomerans*	成团泛菌
				Pantoea ananatis	菠萝多源菌
		鞘氨醇杆菌属	1	*Sphingobacterium multivorum*	多食鞘氨醇杆菌
		窄食单胞菌属	1	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽窄食单胞菌
		链球菌属	1	*Streptococcus uberis*	乳房链球菌
	叶	红球菌属	1	*Rhodococcus rhodochrous*	玫瑰红红球菌
		不动杆菌属	1	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌
		伯克霍尔德氏菌属	1	*Burkholderia cepacia*	洋葱伯克霍尔德氏菌

四、香蕉健株与枯萎病株内生芽胞杆菌及其细菌种类多样性

以分离到的24个菌株为样本，以各菌株在各部位中出现（1）与否（0）为指标，以兰氏距离为尺度，用最长距离法对数据进行系统聚类分析，结果见表5-39和图5-7。只有产气肠杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌是在健株和病株中同时分布的，其他细菌分布于香蕉健株或病株。当λ=2.40时，可将24株细菌分为4个类群。

表5-39　香蕉内生细菌分布多态性

序号	学名	中文名	健株			病株		
			根	茎	叶	根	茎	叶
1	*Acetobacter aceti*	醋酸醋杆菌	0	0	0	0	1	0
2	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	0	0	0	0	0	1
3	*Brevundimonas vesicularis*	泡囊短波单胞菌	0	0	1	0	0	0
4	*Burkholderia cepacia*	洋葱伯克霍尔德氏菌	0	0	0	0	0	1
5	*Chryseobacterium balustinum*	大比目鱼黄杆菌	0	0	0	0	1	0
6	*Corynebacteriu matruchotii*	马氏棒杆菌	1	0	1	0	0	0
7	*Diphtheria intermedius*	中间白喉棒杆菌	1	0	1	0	0	0
8	*Enterobacter aerogenes*	产气肠杆菌	0	0	1	0	1	0
9	*Enterobacter cloacae*	阴沟肠杆菌	0	0	0	1	0	1
10	*Escherichia coli*	大肠杆菌	1	0	1	0	0	0

续表

序号	学名	中文名	健株			病株		
			根	茎	叶	根	茎	叶
11	*Kurthia sibirica*	西伯利亚库特氏菌	0	0	1	0	0	0
12	*Lactobacillus acetotoleran*	乳酸杆菌	0	0	0	0	1	0
13	*Microbacterium chocolatum*	巧克力微杆菌	0	0	0	0	1	0
14	*Microbacterium liquefaciens*	液化微杆菌	1	0	1	0	0	0
15	*Morganella-morganii*	摩氏摩根菌	1	1	0	0	0	0
16	*Pantoea agglomerans*	成团泛菌	0	0	0	0	1	0
17	*Pantoea ananatis*	菠萝多源菌	0	0	0	0	1	0
18	*Psychrobacter phenylpyruvicus*	苯丙酮酸冷杆菌	0	0	0	0	1	1
19	*Rhodococcus rhodochrous*	玫瑰红红球菌	0	0	0	0	0	1
20	*Salmonella typhimurium*	鼠伤寒沙门氏菌	0	0	0	1	0	0
21	*Sphingobacterium mμltivorum*	多食鞘氨醇杆菌	0	0	0	0	1	0
22	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽窄食单胞菌	1	1	1	0	1	0
23	*Streptococcus uberis*	乳房链球菌	0	0	0	0	1	0
24	*Vibrio hollisae*	霍氏弧菌	0	0	0	1	0	1

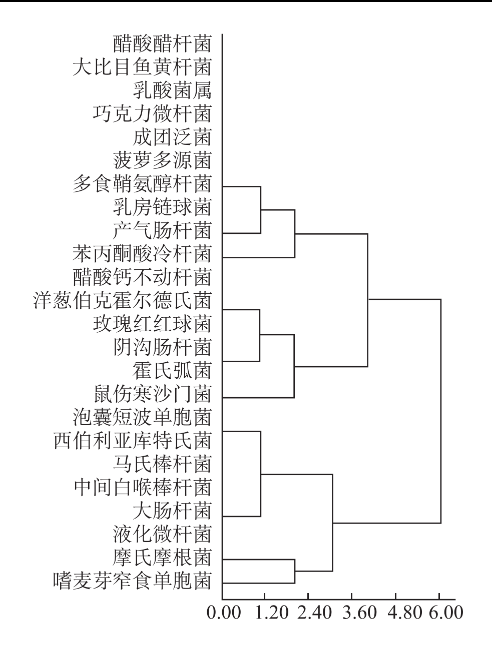


图 5-7　香蕉内生细菌分布多态性

类群Ⅰ包括 10 个菌株，均在病株的茎部分布。包括 1 醋酸醋杆菌（*Acetobacter aceti*）、5 大比目鱼黄杆菌（*Chryseobacterium balustinum*）、12 乳酸菌（*Lactobacillus acetotoleran*）、

13 巧克力微杆菌（*M. chocolatum*）、16 成团泛菌　（*P. agglomerans*）、17 菠萝多源菌（*Pantoea ananatis*）、21 多食鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium mμltivorum*）、23 乳房链球菌（*Streptococcus uberis*）、8 产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）和 18 苯丙酮酸冷杆菌（*Psychrobacter phenylpyruvicus*）。其中，18 苯丙酮酸冷杆菌（*Psychrobacter phenylpyruvicus*）在病株的叶部也有分布。

类群Ⅱ包括 6 个菌株，分布在病株的根部和叶部。其中菌株 2 醋酸钙不动杆菌（*A. calcoaceticus*）、4 洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）和 19 玫瑰红红球菌（*Rhodococcus rhodochrous*）仅在病株的叶部分布。菌株 9 阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）和 24 霍氏弧菌（*Vibrio hollisae*）在病株的根部和叶部分布。菌株 20 鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*）仅在病株的根部分布。

类群Ⅲ包括 6 个菌株，分布在健株的根部和叶部。菌株 3 泡囊短波单胞菌（*Brevundimonas vesicularis*）和 11 西伯利亚库特氏菌（*Kurthia sibirica*）仅分布在健株的叶部。菌株 6 马氏棒杆菌（*Corynebacteriu matruchotii*）、7 中间白喉棒杆菌（*Diphtheria intermedius*）、14 液化微杆菌（*M. liquefaciens*）和 10 大肠杆菌（*E. coli*）则分布在根部和叶部。

类群Ⅳ包括两个菌株，菌株 15 摩氏摩根菌和 22 嗜麦芽窄食单胞菌，共同特性是分布在健株的根部和茎部。菌株 22 嗜麦芽窄食单胞菌，在健株的叶部和病株的茎部也有分布。

五、香蕉健株与枯萎病株不同部位内生芽胞杆菌及其细菌含量多态性

香蕉植株不同部位内生细菌的多态性见表 5-40 和图 5-8。香蕉健株各部位内生细菌的含量存在差异，香蕉健株上部叶片、中部叶片、下部叶片、茎部和根部内生细菌的平均数量分别为 $1.86×10^4$CFU/g、$166.69×10^4$CFU/g、$0.003×10^4$CFU/g、$72.736×10^4$CFU/g 和 $519.5×10^4$CFU/g；根部的内生细菌含量最高，下部叶片内生细菌的含量最低。香蕉病株相应各部位的内生细菌平均数量分别为 $4.15×10^4$CFU/g、$13.86×10^4$CFU/g、$0.42×10^4$CFU/g、$1052.06×10^4$CFU/g 和 $6.77×10^4$CFU/g，其中茎部内生细菌的数量显著高于其他部位。

表 5-40　香蕉健株不同部位分离到的内生细菌数量特征

分离部位	上部叶片	中部叶片	下部叶片	假茎部	根部
健株/（$×10^4$CFU/g）	1.86	166.69	0.003	72.736	519.5
病株/（$×10^4$CFU/g）	4.15	13.86	0.42	1052.06	6.77

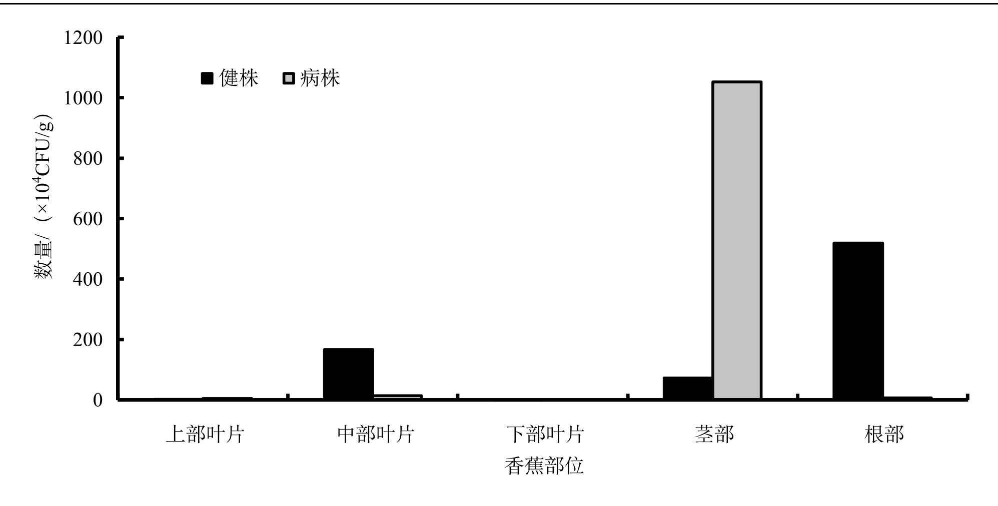


图 5-8　芭蕉属植株不同部位内生细菌数量

六、讨论

对于植物内生细菌的研究目前已成为热点，涉及的植物主要有小麦、水稻、棉花、花生、马铃薯、番茄、烟草等（蓝江林等，2010；王刚和李志强，2005；沈德龙等，2002；罗明等，2004；宋子红等，1999；黎起秦等，2004；周婧等，2008；Fernando *et al.*，2005；付业勤等，2007；孙义等，2008；Angela *et al.*，2004）。蓝江林等（2010）采用平板分离纯化芭蕉、威廉斯蕉和野生蕉植株内生细菌，利用细菌脂肪酸鉴定技术进行鉴定，共获得内生细菌 11 属 14 种，其中分离得到野生蕉植株 9 种，威廉斯蕉植株 7 种，芭蕉植株 3 种。付业勤等（2007）从香蕉健康植株的根、假茎、叶柄、叶片等组织中分离获得 386 份内生细菌分离物，这些分离物的基础生物学特性的分类地位初步归属为不动杆菌属（*Acinetobacter*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）、短杆菌属（*Brevibacterium*）、产碱杆菌属（*Alcaligenes*）和伯克霍尔德菌属（*Burkholderia*）细菌（Angela *et al.*，2004）。

脂肪酸生物标记技术已经广泛用于细菌的鉴定和多样性研究，采用相似性指数高于 0.5 的细菌鉴定的结果，能可靠地反映细菌鉴定的种类（MIDI，2002）。从香蕉植株的根部、假茎、叶片分离获得 26 株内生细菌。其中微杆菌属（*Microbacterium*）（Denise *et al.*，2002）、泛菌属（*Pantoea*）（Siva and Gwyn，2003）作为植物内生细菌，已从不同的植物组织中分离到并有一定的研究。对于其他种类的内生细菌，也有相关的文献研究，如短波单胞菌属（*Brevundimonas*）、红球菌属（*Rhodococcus*）来源于土壤（Werf *et al.*，1999；胡宜刚等，2008），棒杆菌属（*Corynebacterium*）来源于污染水体（林玉满等，2008），对于它们在植物体内的定殖特性，尚需进一步的研究证实。

生物多样性是衡量生态系统稳定和健康的一个重要指标（Bertollo *et al.*，2001）。马铃薯内生细菌的群落结构与病原菌的存在和消失密切相关，受 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 侵染的马铃薯病株内生细菌的群落多样性要高于健康植株（Birgit *et al.*，2002）。研究表明，香蕉病株的内生细菌群落多样性要高于香蕉健株，健株共分离获得 9 株内生细菌，分属 9 个属，6 种细菌分布在根部，茎部分离到 2 种细菌，叶部分离到 8 种细菌。

香蕉病株共分离获得 17 株内生细菌，分属 15 个属，从根部分离到 3 种细菌，茎部分离到 11 种，叶部共分离到 6 种。就内生细菌的含量来看，香蕉健株根部的内生细菌含量最高，达 519.5×10^4CFU/g，下部叶片内生细菌的含量最低，仅为 0.003×10^4CFU/g。香蕉病株茎部内生细菌的数量显著高于其他部位，达 1.05×10^7CFU/g。

研究利用分离培养的方法获得香蕉内生细菌，并通过全自动微生物鉴定系统对内生细菌进行了初步鉴定，从种类及数量等方面分析了香蕉植株内生细菌的群落结构特性，研究结果尚无法深层次地揭示香蕉植株内生细菌的种群特性。有关内生细菌定殖特性、互作关系及在香蕉植株生长代谢过程的功能等，都有待进一步的研究。

第六节　禾本科牧草内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

了解植物内生细菌的群落结构多样性及其分布特性，对于研究内生细菌的作用机制、更加有效地利用内生细菌资源等具有重要意义。本研究采用美国 MIDI 微生物鉴定系统对不同品种禾本科牧草植株分离的内生细菌进行鉴定，了解内生细菌在禾本科牧草植株不同品种和不同部位的分布特性，为内生细菌资源的进一步研究和开发利用奠定基础。研究方法如下。

二、研究方法

1）供试材料。从福建省农科院生态研究所采集的 5 个禾本科牧草品种，分别为杂交狼尾草‘闽牧六号’、杂交狼尾草、矮象草、杂交狼尾草‘南牧一号’、杂交狼尾草辐射品种。样本采回实验室后 24h 内进行微生物的分离。细菌分离与纯化培养均采用 NA 培养基。

2）牧草内生细菌的分离。分别称取牧草根部、茎部和叶片样品各 5g，冲洗干净后吸去水分，用 75%乙醇浸 30～40s，再转入 10%次氯酸钠溶液中浸 8min，无菌水漂洗 3 次，无菌滤纸吸干。用无菌剪刀剪碎样品于无菌研钵中，充分研磨匀浆，用无菌水适量梯度稀释，各取 200μl 稀释液涂布于不同培养基进行内生细菌、真菌和放线菌的分离，重复 3 次。根据菌落形态、颜色、边缘状态、透明度、表面干湿状态等特征判断分离出的菌落种类并计数。按常规方法挑取单菌落纯化后保存，供测试鉴定。

3）牧草内生细菌的脂肪酸鉴定。参见第五章第三节。

4）内生细菌在禾本科牧草植株内的分布特性。以分离到的内生菌菌株为样本，以各菌株在各部位出现与否为指标，组成“0-1”数据矩阵，将所得数据输入 DPS 数据处理系统，采用马氏距离为聚类尺度，以类平均法对数据进行系统聚类分析，并自动生成各供试菌株的聚类图和相异系数表。

三、禾本科牧草植株内生芽胞杆菌及其细菌含量

实验结果见表 5-41 和图 5-9。不同禾本科牧草植株内生细菌含量差异显著，杂交狼尾草‘闽牧六号’内生细菌含量最高，达 26.800×10^4CFU/g，其次是杂交狼尾草辐射品种，达 6.850×10^4CFU/g，矮象草、杂交狼尾草‘南牧一号’和杂交狼尾草内生细菌含量差不多，分别为 0.525×10^4CFU/g、0.462×10^4CFU/g 和 0.682×10^4CFU/g。

具体到各个部位，不同禾本科牧草不同部位内生细菌含量差异也显著。叶部的内生细菌含菌量规律为杂交狼尾草‘闽牧六号’≌杂交狼尾草辐射品种＞杂交狼尾草＞杂交狼尾草‘南牧一号’＞矮象草；茎部的内生细菌含菌量规律为杂交狼尾草‘闽牧六号’＞杂交狼尾草‘南牧一号’＞杂交狼尾草，矮象草和杂交狼尾草辐射品种的茎部未分离到内生细菌；根部的内生细菌含菌量规律为杂交狼尾草‘闽牧六号’＞杂交狼尾草辐射品种＞矮象草＞杂交狼尾草‘南牧一号’＞杂交狼尾草。

表 5-41　禾本科牧草植株内生细菌含量及分布

分离部位	内生细菌的含量/(×10^4 CFU/g)				
	杂交狼尾草‘闽牧六号’	矮象草	杂交狼尾草辐射品种	杂交狼尾草‘南牧一号’	杂交狼尾草
根部	15.500	0.500	1.650	0.400	0.101
茎部	6.000	0.000	0.000	0.002	0.001
叶片	5.300	0.025	5.200	0.060	0.580
合计	26.800	0.525	6.850	0.462	0.682

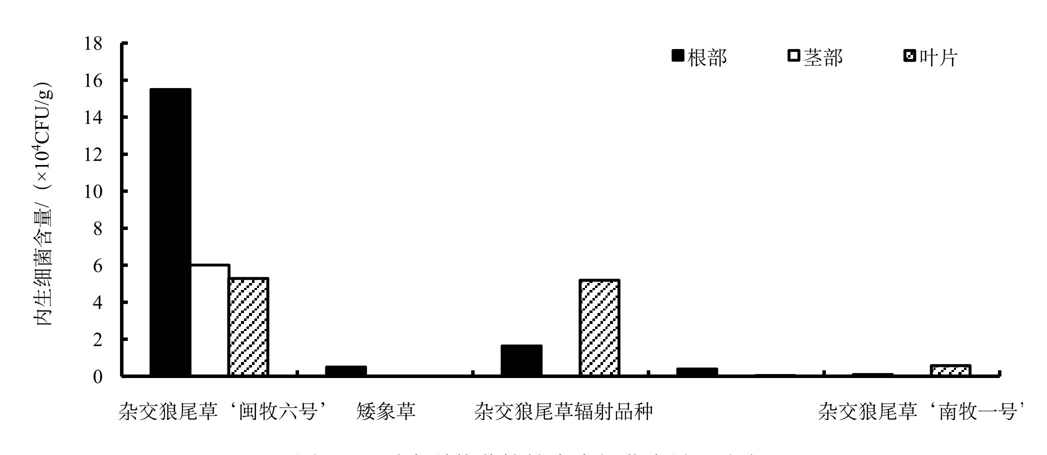


图 5-9　禾本科牧草植株内生细菌含量及分布

四、禾本科牧草内生芽胞杆菌及其细菌鉴定

64 株内生细菌中与 MIDI 数据库比较相似性指数大于 0.500，可确定其菌种名称的有 50 株，属于 19 个种，隶属于 12 个属（表 5-42），分别是沙门氏菌属（*Salmonella*）、

假单胞杆菌属（*Pseudomonas*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）、西地西菌属（*Cedecea*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）、微球菌属（*Micrococcus*）、克吕沃尔氏菌属（*Kluyvera*）、短波单胞菌属（*Brevundimonas*）、沙雷氏菌属（*Serratia*）、柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）和单胞菌属（*Sphingomonas*）。其中芽胞杆菌属包含 6 个种，假单胞杆菌属包含 3 个种，其余 10 个属均包含 1 个种。

表 5-42　禾本科牧草内生细菌

菌株编号	属	种名	中文种名	相似系数*
4946	短波单胞菌属	*Brevundimonas vesicularis*	泡囊短波单胞菌	0.507
4948	沙雷氏菌属	*Serratia odorifera*	气味沙雷氏菌	0.741
4949	柠檬酸杆菌属	*Citrobacter freundii*	弗氏柠檬酸杆菌	0.877
4950	单胞菌属	*Sphingomonas sanguinis*	单胞菌属细菌（无中文名称）	0.797
4951	假单胞杆菌属	*Pseudomonas aeruginosa*	铜绿假单胞菌	0.943
4954	克雷伯氏菌属	*Klebsiella pneumoniae ozaenae*	臭鼻肺炎克雷伯菌	0.701
4960	芽胞杆菌属	*Paenibasillus larvae*	幼虫类芽胞杆菌	0.532
4964	西地西菌属	*Cedecea davisae*	戴氏西地西菌	0.679
4965	芽胞杆菌属	*Bacillus viscosus*	粘稠芽胞杆菌	0.555
4971	不动杆菌属	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	0.769
4970	芽胞杆菌属	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	0.825
4976	微球菌属	*Micrococcus luteus*	藤黄微球菌	0.730
4983	芽胞杆菌属	*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌	0.879
4999	芽胞杆菌属	*Paenibacillus polymyxa*	多粘类芽胞杆菌	0.846
5000	假单胞杆菌属	*Pseudomonas huttiensis*	假单胞菌属细菌	0.750
5014	克吕沃尔氏菌属	*Kluyvera cryocrescens*	栖冷克吕沃尔菌	0.819
5018	沙门氏菌属	*Salmonella typhimurium*	鼠伤寒沙门氏菌	0.740
5022	芽胞杆菌属	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌	0.650
5031	假单胞杆菌属	*Pseudomonas* pv. *syringae glycinea*	丁香假单胞菌大豆致病变种	0.616

*表示微生物自动鉴定系统对细菌的鉴定判别依赖于相似性指数，当相似性指数大于 0.500，说明匹配性很高，为典型种；大于 0.300 小于 0.500，说明匹配性较低，为非典型种；小于 0.300 说明数据库没有此菌种的数据，给出的是最接近的种

五、禾本科牧草内生芽胞杆菌及其细菌分布特性

以分离到的 19 种内生菌为样本，以各菌株在各部位出现与否为指标，用类平均法对数据进行系统聚类分析，当 λ=8.35 时，可将 19 种内生细菌分为 4 个大类群（表 5-43，表 5-44 和图 5-10）。

类群 I 包括 7 个菌种，分别是 4946（*Brevundimonas vesicularis*）、4948（*Serratia odorifera*）、4949（*Citrobacter freundii*）、4950（*Sphingomonas sanguinis*）、4951（*Pseudomonas aeruginosa*）、4954（*Klebsiella pneumoniae ozaenae*）和 4960（*P. larvae pulvifaciens*），它们的共同特征是均分离自杂交狼尾草‘闽牧六号’。

表 5-43　聚类过程

T	*I*	*J*	距离
1	2	1	0
2	3	1	0
3	5	4	0
4	7	6	0
5	9	8	0
6	6	4	5.45843
7	15	14	5.99985
8	18	7	5.99995
9	12	11	5.99999
10	10	8	6.7233
11	14	13	6.6742
12	17	16	6.67425
13	19	16	7.27793
14	1	8	7.66101
15	4	1	8.5432
16	16	13	8.88522
17	8	1	10.66014
18	13	1	13.33088

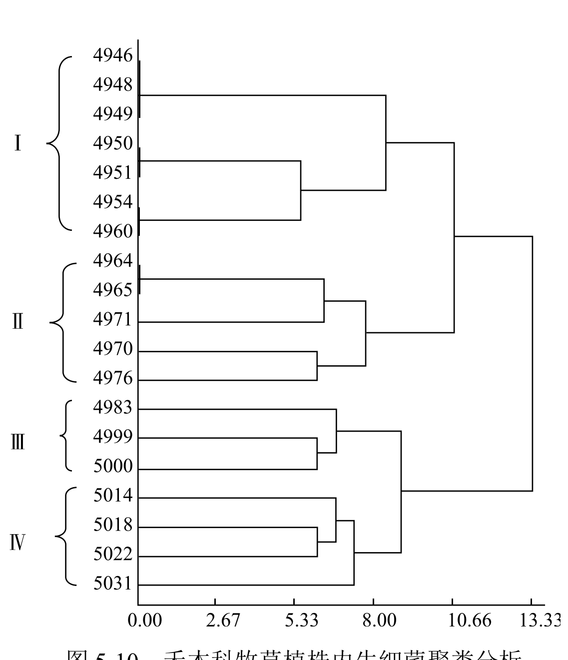


图 5-10　禾本科牧草植株内生细菌聚类分析

表 5-44　禾本科牧草植株不同部位内生细菌的种类和分布

菌株编号	种名	杂交狼尾草‘闽牧六号’			矮象草			杂交狼尾草辐射品种			杂交狼尾草‘南牧一号’			杂交狼尾草		
		根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶
4946	*Brevundimonas vesicularis*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4948	*Serratia odorifera*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4949	*Citrobacter freundii*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4950	*Sphingomonas sanguinis*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4951	*Pseudomonas aeruginosa*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4954	*Klebsiella pneumoniae ozaenae*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4960	*Paenibasillus larvae*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4964	*Cedecea davisae*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4965	*Bacillus viscosus*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4971	*Acinetobacter calcoaceticus*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4970	*Bacillus cereus*	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0

续表

菌株编号	种名	杂交狼尾草‘闽牧六号’			矮象草			杂交狼尾草辐射品种			杂交狼尾草‘南牧一号’			杂交狼尾草		
		根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶
4976	*Micrococcus luteus*	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4983	*Bacillus megatherium*	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
4999	*Paenibacillus polymyxa*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5000	*Pseudomonas huttiensis*	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5014	*Kluyvera cryocrescens*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5018	*Salmonella typhimurium*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5022	*Lysinibacillus sphaericus*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5031	*Pseudomonas* pv. *syringae glycinea*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

类群Ⅱ包括 5 个菌种，分别是 4964（*Cedecea davisae*）、4965（*B. viscosus*）、4971（*A. calcoaceticus*）、4970（*B. cereus*）和 4976（*Micrococcus luteus*），存在于矮象草和杂交狼尾草辐射品种。

类群Ⅲ包括 3 个菌种，分别是 4983（*B. megatherium*）、4999（*Panebacillus polymyxa*）和 5000（*Pseudomonas huttiensis*），其共同特征是在‘杂交狼尾草’叶片内均有存在。

类群Ⅳ包括 4 个菌种，分别是 5014（*Kluyvera cryocrescens*）、5018（*S. typhimurium*）、5022（*L. sphaericus*）和 5031（*Pseudomonas* pv. *syringae glycinea*），共同特征是均存在于杂交狼尾草‘南牧一号’和杂交狼尾草植株中。在每个大类群中又可以分为不同的亚类群。例如，在类群Ⅰ中可以分为 3 个亚类群，第 1 个亚类群为菌株 4946（*Brevundimonas vesicularis*）、4948（*Serratia odorifera*）和 4949（*Citrobacter freundii*），其共同特征为存在于杂交狼尾草‘闽牧六号’茎部，第 2 个亚类群为 4950（*Sphingomonas sanguinis*）和 4951（*Pseudomonas aeruginosa*），共同存在于杂交狼尾草‘闽牧六号’叶片中，第 3 个亚类群为 4954（*Klebsiella pneumoniae ozaenae*）和 4960（*P. larvae*），共同存在于杂交狼尾草‘闽牧六号’根部。说明牧草内生菌在不同牧草植株内的分布与宿主植株和不同部位密切相关，尤其与宿主植株相关。

六、讨论

脂肪酸是生物体内不可缺少的能量和营养物质，是生物体的基本结构成分之一，脂肪酸和细菌的遗传变异、毒力、耐药性等关系密切（张国赏等，2000；Riley *et al.*，2001）。细菌细胞结构中普遍含有的脂肪酸成分与细菌 DNA 具有高度的同源性，各种细菌均具有特征性的细胞脂肪酸指纹图谱（刘志辉等，2005）。国内外已有将脂肪酸用于细菌鉴定的报道（Ozbek and Aktas, 2003；Müller *et al*., 1998；Basile *et al*., 1995）。

根据植物与内生细菌的关系可将内生细菌分为兼性内生细菌和专性内生细菌。目前假单胞菌属（*Pseudomonas*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、沙雷氏菌属（*Serratia*）、产碱菌属（*Alcaligenes*）、志贺氏菌属（*Shigella*）和柠檬细菌属（*Citrobacter*）及革兰氏

阳性细菌一些属的内生细菌都属于兼性内生，它们不仅存在于植物的根、茎、叶，还常见于土壤（王瑶瑶等，2008）。朱育菁等（2008）从茶树中分离出微杆菌属、根瘤菌属等内生菌，从龙眼果实中检测到分属于肠杆菌属、果胶杆菌属（*Pectobacterium*）、克吕沃尔菌属（*Kluyvera*）和沙门氏杆菌属（*Salmonella*）的内生细菌。研究也分离到假单胞菌属、沙雷氏菌属和柠檬细菌属、克吕沃尔菌属（*Kluyvera*）等内生细菌，同时获得的其他属的细菌均有相应的研究文献，且有些已经进行较为详细深入的研究（Cabral *et al.*，2004；Mariët *et al.*，1999；Bernardo *et al.*，2000；Wolf and Hagemann ，2002）。

在植物体内的不同内生菌相互作用，并建立一种生态平衡，其中一些是分离频率高、数量大的优势种群。而另一些属于稀有种（Fisher *et al.*，1992）。对禾本科牧草内生菌进行的脂肪酸鉴定结果表明，芽胞杆菌和假单胞菌是禾本科牧草的优势内生菌群，这与史应武等（2009）的研究结果一致，其在对新疆昌吉和石河子两地种植的甜菜内生菌进行了分离、鉴定和分析的结果表明，甜菜内生菌多属于细菌，其中假单胞菌属和芽胞杆菌属的分离频率分别为 33.2%～59.2%和 12.7%～28.1%，是甜菜植株中的优势内生菌群。

植物内生菌的分布与群落结构不仅与植物的种类、基因型有关，还与植物的生长阶段、环境条件有关，存在复杂的多样性（马同锁等，2009）。研究结果表明，不同品种禾本科牧草内生菌的多样性有所不同，杂交狼尾草‘闽牧六号’内生菌的多样性要高于其他品种，这与朱育菁等（2009）的研究结果相同，在其研究中发现，茶树内生菌的种类与分布因茶树品种和叶片龄期而存在差异。史应武等（2009）在对天山北坡甜菜内生菌的分离研究中也发现，甜菜根中内生菌的多样性高于茎、叶。作者的研究结果与之相同，不同禾本科牧草内生菌在根部的多样性要高于茎部和叶片。对不同品种禾本科牧草植株分离的内生细菌的鉴定及其分布的研究，可以有助于了解内生细菌在禾本科牧草植株不同品种和不同部位的分布特性，为充分地对内生细菌资源进行进一步研究和开发利用奠定了基础。

第七节　水葫芦内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

水葫芦是凤眼莲（*Eichhornia crassipe* （Mart.）Solms.）的俗称，又名布袋莲、水荷花、假水仙，是外来入侵物种，繁殖、适应环境的能力很强，大量掠夺其他生物的生存资源，对生态环境有很大的破坏性，被全世界公认为“十大害草”之一。水葫芦对环境有着其独特的适应力，与其对内生菌种群的选择存在着相互关系。本研究对水葫芦的内生细菌的种类及群落结构特性进行了初步研究，有助于揭示水葫芦对环境适应的机理，为选择科学的防除方法提供研究基础。研究对水葫芦内生菌进行分离，并对分离的细菌利用全自动微生物鉴定系统进行鉴定，初步了解水葫芦内生细菌的种类及种群结构，为今后水葫芦的微生物防治研究奠定实验基础。试验方法如下。

二、研究方法

1）试验材料。水葫芦，采自福州快安。培养基：根据不同含盐量、不同 pH、培养专性差异等条件，共选择 20 种培养基。见表 5-45。气相色谱系统：美国 Agilent 6890N 型，包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器。分析软件：美国 MIDI 公司开发的基于微生物细胞脂肪酸成分鉴定的全自动微生物鉴定系统 Sherlock MIS4.5（Microbial Identification System）和 LGS4.5（Library Generation Software）。

表 5-45　培养基种类

编号	培养基	编号	培养基	编号	培养基	编号	培养基
1	嗜盐菌选择性琼脂培养基	6	细菌培养基（ATCC 573）	11	NA 培养基	16	黄豆芽汁培养基 pH7.2～7.4
2	固氮菌培养基	7	察氏琼脂培养基（ATCC 312）	12	LB 培养基	17	PDA 培养基
3	乳酸菌培养基	8	碱性营养琼脂培养基（DSM 31）	13	高氏 1 号培养基	18	萨氏培养基
4	根瘤菌培养基	9	纤维细菌合成培养基	14	面粉琼脂培养基	19	甘露醇琼脂培养基
5	氧化亚铁硫杆菌培养基	10	葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基	15	黄豆芽汁培养基	20	乙酸菌培养基

2）内生细菌的分离。将水葫芦整株用自来水冲洗干净，用吸水滤纸吸干水分，称重。然后整株完全浸入 10%的 $KClO_3$ 8min，取出，用无菌水充分淋洗，在灭菌的研钵中充分研磨，收集匀浆，共 200ml。梯度稀释后涂布平板。静置 20min，30℃条件下倒置培养 24～48h。统计菌落种类和数量。以组织消毒后用无菌水淋洗的淋洗液作为CK，如长菌落，则判定研磨液所培养的菌落为非内生菌，丢弃；若 CK 中无菌落，则基本可判定在研磨液中长出的菌落可能是内生菌，纯化，于 4℃的冰箱中保存待用。根据菌落形态的不同，挑取不同形态的单菌落分别在 NA 平板以四线法划线培养 48h。将各培养基视为一种微生物生存生境，采用 Berger-Parker 的优势度指数，统计分析各培养基分离的细菌种类数占总分离的细菌种类数的比例，作为分析水葫芦内生菌对培养基的适应性，优势度指数越高，对培养基的适应性越好，公式如下：优势度指数 D：$D=N/N_T$，式中，N 为各种培养基分离的内生细菌的种数，N_T 为分离到内生细菌的总种数。

3）内生细菌的脂肪酸鉴定。见第五章第三节。

三、水葫芦内生芽胞杆菌及其细菌分离培养基选择

实验结果见表 5-46 和图 5-11。根据不同含盐量、不同 pH、培养专性差异等条件，选择 20 种培养基，共分离鉴定菌株 56 株。pH 为 8.7、含盐量为 4%的 1 号嗜盐菌选择性琼脂培养基和 pH 为 2、含盐量为 5.08% 的 5 号氧化亚铁硫杆菌培养基，分离到内生细

菌的数量均为零。

表 5-46　各培养基分离鉴定内生菌种类的数量

编号	培养基	pH	含盐量/%	种类/个	优势度指数
1	嗜盐菌选择性琼脂培养基	8.7	4.00	0	0.0000
2	固氮菌培养基	7.2	0.13	3	0.0536
3	乳酸菌培养基	7.0	0.20	3	0.0536
4	根瘤菌培养基	7.2	0.00	7	0.1250
5	氧化亚铁硫杆菌培养基	2.0	5.08	0	0.0000
6	细菌培养基（ATCC 573）	4.0	0.20	0	0.0000
7	察氏琼脂培养基（ATCC 312）	5.6	0.50	1	0.0179
8	碱性营养琼脂培养基（DSM 31）	9.7	0.86	0	0.0000
9	纤维细菌合成培养基	7.2	3.07	0	0.0000
10	葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基	7.0	0.80	9	0.1607
11	NA 培养基	7.2	0.50	7	0.1250
12	LB 培养基	7.0	0.00	3	0.0536
13	高氏 1 号培养基	7.3	0.03	0	0.0000
14	面粉琼脂培养基	7.4	0.00	2	0.0357
15	黄豆芽汁培养基	6.8	0.00	3	0.0536
16	黄豆芽汁培养基 pH7.2～7.4	7.3	0.00	5	0.0893
17	PDA 培养基	7.1	0.00	3	0.0536
18	萨氏培养基	7.1	0.00	3	0.0536
19	甘露醇琼脂培养基	7.1	0.00	2	0.0357
20	乙酸菌培养基	6.8	2.00	5	0.0893

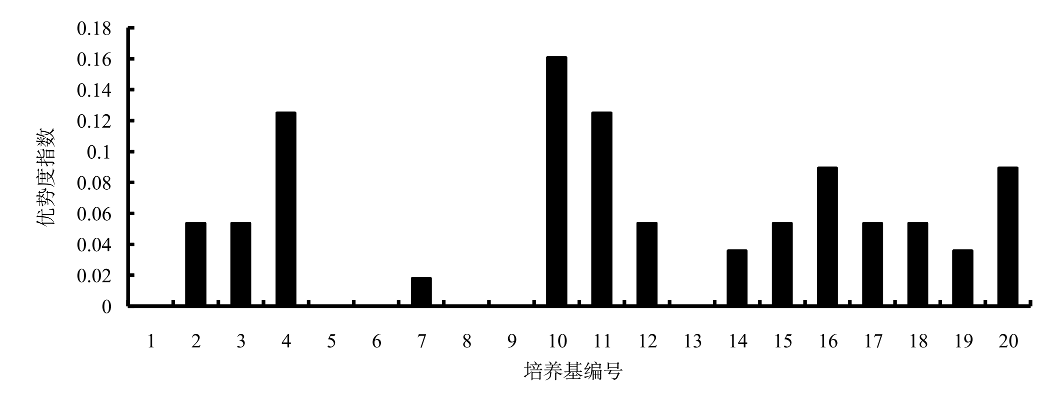


图 5-11　不同培养基分离水葫芦内生细菌的优势度指数

13 号高氏 1 号培养基分离到的内生细菌在 TSB 培养基上生长状况较差，无法进行鉴定，鉴定数量为 0。6 号细菌培养基（ATCC 573）、8 号 Czapek-Dox Agar（ATCC 312）、

9 号碱性营养琼脂培养基（DSM 31）均有一种菌落形态的内生细菌生长，但在 Sherlock MIS4.5 系统中鉴定相似度指数低于 0.3，系统内无可匹配的结果，故鉴定种类数量为 0。10 号葡萄糖、酵母、淀粉琼脂培养基分离获得内生细菌 9 种，优势度指数为 0.1607。4 号根瘤菌培养基分离获得内生细菌 7 种，优势度指数为 0.1250。11 号 NA 培养基分离获得内生细菌 7 种，优势度指数为 0.1250。16 号黄豆芽汁培养基（pH7.2～7.4）分离获得内生细菌 5 种，优势度指数为 0.0893。20 号乙酸菌培养基分离获得内生细菌 5 种，优势度指数为 0.0893。从分离鉴定结果来看，20 种培养基中，pH4～9.7，含盐量小于 4%的培养基均可用于水葫芦内生细菌的分离培养。从分离到内生菌生长数量、菌落种类综合考虑，水葫芦内生菌生长适宜的 pH 为 6.8～7.2，含盐量小于 4%。

四、水葫芦内生芽胞杆菌及其细菌种群结构

实验结果见表 5-47。水葫芦内生菌的平均数量约为 1.21×10^5CFU/g。对分离纯化后的 146 株细菌菌株进行鉴定，最终获得 56 种（株）内生细菌。

表 5-47　水葫芦内生细菌种类

属	菌株	种	
不动杆菌属	1	*Acinetobacter calcoaceticus*	不动杆菌属醋酸钙种
产碱杆菌属	1	*Alcaligenes xylosoxydans*	木糖氧化产碱杆菌
水生螺旋菌属	1	*Aquaspirillum autotrophicum*	
节杆菌属	2	*Arthrobacter globiformis*	球状节杆菌
		Arthrobacter ureafaciens	烟草节杆菌
芽胞杆菌属	5	*B. coagulans*	凝结芽胞杆菌
		B. laevolacticus	芽胞型乳酸菌
		B. megatherium	巨大芽胞杆菌
		B. pumilus	短小芽胞杆菌
		L. sphaericus	球形赖氨酸芽胞杆菌
博德特菌属	1	*Bordetella avium*	鸟博德特菌
短波单胞菌属	1	*Brevundimonas vesicularis*	泡囊短波单胞菌
纤维单胞菌属	1	*Cellulomonas flavigena*	产黄纤维单胞菌
棒杆菌属	1	*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*	密执安棒杆菌环腐亚种
棒状杆菌属	2	*Corynebacterium diphtheriae intermedius*	棒状杆菌中间型亚种
		Corynebacterium matruchotii	棒状杆菌
短小杆菌属	2	*Curtobacterium flaccumfaciens* pv.*betae*	萎蔫短小杆菌糖甜菜致病变种
		Curtobacterium pusillum	
肠杆菌属	1	*Enterobacter gergoviae*	日勾维肠杆菌
爱文菌属	1	*Ewingella americana*	美洲爱文菌
库克菌属	1	*Kocuria kristinae*	克氏库克菌（克氏微球菌）

续表

属	菌株	种	
微杆菌属	9	*Microbacterium barkeri*	（浅黄金杆菌）
		Microbacterium esteraromaticum	
		Microbacterium esteraromaticum (*Aureobacterium*)	
		Microbacterium flavescens	
		Microbacterium hominis	
		Microbacterium imperiale	
		Microbacterium lacticum	
		Microbacterium liquefaciens	
		Microbacterium saperdae	
微球菌属	2	*Micrococcus luteus*	藤黄微球菌
		Micrococcus luteus	藤黄微球菌
涅斯捷连科氏菌属	1	*Nesterenkonia halobia*	盐生内斯特兰克菌
奴卡菌属	1	*Nocardia nova*	新星诺卡菌
新鞘脂菌属	1	*Novosphingobium capsulatum*	少动鞘氨醇杆菌
类芽胞杆菌属	1	*Panebacillus macerans*	浸麻类芽胞杆菌
泛菌属	2	*Pantoea agglomerans*	成团泛菌（肠杆菌属）
		Pantoea ananatis/Erwinia uredovora	成团泛菌/噬夏孢欧文氏菌
Paucimonas	1	*Paucimonas lemoignei*	
片球菌属	1	*Pediococcus acidilactici*	嗜酸片球菌
发光杆菌属	1	*Photorhabdus luminescens*	无色杆菌（嗜线虫杆菌属）
假单胞菌	7	*Pseudomonas aeruginosa*	绿脓杆菌
		Pseudomonas agarici	伞菌假单胞菌
		Pseudomonas fluorescens	荧光假单胞菌同型小种 A
		Pseudomonas putida	恋臭假单胞菌同型小种 A
		Pseudomonas putida	恋臭假单胞菌同型小种 B
		Pseudomonas putida	恋臭假单胞菌同型小种 B
		Pseudomonas vancouverensis	
土壤杆菌属	1	*Rhizobium rubi*	根瘤土壤杆菌
红球菌属	2	*Rhodococcus erythropolis*	红串红球菌
		Rhodococcus rhodnii	红色红球菌
罗氏菌属	1	*Rothia dentocariosa*	龋齿罗氏菌
葡萄球菌属	1	*Staphylococcus epidermidis*	表皮葡萄球菌
贪噬菌属	1	*Variovorax paradoxus*	贪噬菌
黄色杆菌属	1	*Xanthobacter flavus*	
耶尔森氏菌属	1	*Yersinia pseudotuberculosis*	假结核耶尔森菌

五、水葫芦内生芽胞杆菌及其细菌菌落特征

根据不同培养基分离到各种细菌的频率，假单胞菌属（*Pseudomonas*）、微杆菌属（*Microbacterium*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、芽胞杆菌属（*Bacillus*）和泛菌属（*Pantoea*）占所分离细菌的50%以上。菌落形态特性见表5-48。假单胞菌属为严格好氧，革兰氏阴性菌，直或微弯杆菌，不产生芽胞，氧化酶阳性或阴性，接触酶阳性。菌落淡黄色，较厚，表面光滑，湿润，有光泽，边缘不圆整。微杆菌属为好氧，革兰氏阳性菌，细长、不规则的杆菌，不产生芽胞，接触酶阳性。菌落不透明，有光泽，黄色。肠杆菌属为兼性厌氧，革兰氏阴性菌，长杆状，不产生芽胞，氧化酶阴性。菌落表面光滑，边缘整齐，隆起，不透明，浅黄色。芽胞杆菌属为需氧或兼性厌氧，革兰氏阳性菌，直杆状，产生芽胞，接触酶阳性。菌落圆形，隆起，淡黄色。泛菌属为兼性厌氧，革兰氏阴性菌，直杆状，不产生芽胞，氧化酶阴性，接触酶阴性。菌落圆形，半透明，灰白变浅黄色

表5-48　水葫芦主要内生细菌菌落形态特征

	假单胞菌属	微杆菌属	肠杆菌属	芽胞杆菌属	泛菌属
菌落	淡黄色，较厚，表面光滑，湿润，有光泽，边缘不圆整	不透明，有光泽，黄色	表面光滑，边缘整齐，隆起，不透明，浅黄色	圆形，隆起，淡黄色	圆形，半透明，灰白变浅黄色
菌落图					

六、水葫芦内生芽胞杆菌及其细菌生理特性

试验分离的水葫芦内生细菌生理特性见表5-49。56株细菌分别属于32个属。从各属分离到的种类来看，种类最多的是微杆菌属（*Microbacterium*），共有9种细菌。其次为假单胞菌属（*Pseudomonas*），共有7种细菌。芽胞杆菌属（*Bacillus*）有5种细菌。节杆菌属（*Arthrobacter*）、棒状杆菌属（*Corynebacterium*）、短小杆菌属（*Curtobacterium*）、微球菌属（*Micrococcus*）、泛菌属（*Pantoea*）和红球菌属（*Rhodococcus*）均有两种细菌。其余23个属各只有一种细菌。

表5-49　水葫芦主要内生细菌的生理特征

属	形态	革兰氏反应	芽胞	接触酶	氧化酶	需氧性
假单胞菌属（*Pseudomonas*）	直或微弯的杆菌	–	–	+	+/–	好氧
微杆菌属　（*Microbacterium*）	细长、不规则杆菌	+	–	+		好氧
肠杆菌属（*Enterobacter*）	长杆菌	–	–		–	好氧/兼性厌氧
芽胞杆菌属（*Bacillus*）	直杆状	+	+	+		好氧/兼性厌氧
泛菌属（*Pantoea*）	直杆状	–	–	–	–	兼性厌氧

七、讨论

植物内生菌广泛存在并具有丰富的生物多样性，目前在多种农作物及果树等经济作物中发现的内生菌已超过 129 种（隶属于 54 个属）。其中假单胞菌属、芽胞杆菌属、肠杆菌属及土壤杆菌属为最常见属。本试验选择 20 种培养基对水葫芦的内生细菌进行分离，共得到 32 个属 56 种内生细菌，说明其种群结构是丰富的。从各属分离到的种类来看，最多的是微杆菌属，共有 9 种细菌。其次为假单胞菌属，共有 7 种细菌。芽胞杆菌属有 5 种细菌。其余 23 个属均有一种。根据不同培养基分离到各种细菌的频率，依次为假单胞菌属、微杆菌属、肠杆菌属、芽胞杆菌属和泛菌属，占所分离细菌的 50%以上。虽然植物内生菌的研究有过许多的报道，但水葫芦内生细菌的种类多样性研究在国内外文献中尚未见相关报道。不同的培养基，分离的微生物种类优势度指数不同，4 号根瘤菌培养基和 11 号 NA 培养基的优势度指数为 0.1250，分离得到的内生菌种类最多，为 7 种；其次是 16 号黄豆芽汁培养基（pH7.2～7.4）和 20 号乙酸菌培养基，优势度指数为 0.0893，分离获得内生细菌 5 种。将各培养基作为微生物生长的生境看待，优势度反映了各微生物物种数量的变化情况，表明内生菌对培养基生境的生态学适应性，也为水葫芦内生菌的分离培养基选择提供了依据。

在内生菌与植物长期协同进化的过程中，二者形成了稳定的生态关系，内生菌-宿主之间处于动态的平衡。植物体为内生菌提供生长必需的能量和营养，内生菌又可通过自身的代谢产物或借助于信号转导作用对植物体产生影响。研究表明内生菌能够促进植株生长（刘国奇和蒋如璋，1999），许多内生菌可产生 IAA、吲哚乙腈以及细胞激动素等植物生长激素、还可增进宿主植物对氮、磷等营养元素的吸收。此外内生菌可提高植株对环境胁迫的抗性（洪永聪等，2001）。

一般认为，植物内生细菌作为植物微生态系统中的天然组成成分，它们可能促进了寄主植物对环境的适应，加强了系统的生态平衡（黎起秦等，2004）。这种相互依存、互相制约的关系，是内生细菌应用研究的基础。利用内生菌作为新的生防因子是目前生防研究的一个热点，研究主要集中在内生菌作为病害防治、促生因子等方面（马艳等，2006；Zou and Tan，1999；Ravel *et al.*，1997）。在本试验所分离到的内生菌已经有许多属的菌株作为生防菌加以开发利用，如假单胞菌属（马艳等，2006；何红等，2004）、芽胞杆菌属（刘国奇等，1999；傅正擎和郑勤，1999）、泛菌属（傅正擎和郑勤，1999）等。

植物内生菌的分布与群落结构不仅与植物的种类、基因型有关，还与植物的生长阶段、环境条件有关。不同的植物、同种植物不同的生长阶段、不同的生长环境等分离出的内生菌种类不同，表现出复杂的多态性。那么，这样的多态性差异可以成为物种生长环境的一种特殊标记。也就是说，在某种环境条件下生长的同种寄主植物，其内生菌的种类或菌落结构一定有相似的特性；反之，具有相似内生菌种类或群落结构特性的寄主植物，其生长环境也是类似的。

水葫芦为外来入侵物种，在我国南方水域已泛滥成灾，其内生细菌作为水葫芦微生态系统中天然组成成分，独特的群落结构在营养竞争、生态位竞争、促进抗逆反应等方

面促进了水葫芦对环境的适应，从而加强水葫芦和生存环境系统间的生态平衡，使水葫芦更能适应环境而获得更好的生长。了解水葫芦内生菌的种类及群落结构特性，一方面，可以利用这种特性作为水葫芦的微生物标记，用于标记其外部生长环境，动态监测水葫芦生长环境的变化；另一方面，从内生菌群落结构的改变而干扰或控制水葫芦的过度生长泛滥，不失为水葫芦防治的新思路。研究结果所分离到的水葫芦内生细菌共 32 个属 56 种，呈现出多样性和复杂性，每个种属的内生细菌在群体结构中的作用如何，又是如何影响其寄主生长，如何利用这些生防因子对水葫芦进行防控等，都是要继续深入研究的课题。

第八节　夏枯草内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

中国是药用植物资源最丰富的国家之一，药用植物的发现、使用和栽培有着悠久的历史。药用植物在医药中占有重要地位。夏枯草为唇形科夏枯草属植物，是一味常用中药，因其夏至后即枯而得名。夏枯草一般在夏季取其干燥果穗入药，含有丰富的三萜类、甾体类、黄酮类、香豆素、多糖类及挥发油等化学成分（刘悦等，2003），具有清肝泻火、明目、散结消肿等功效（国家药典委员会，2010）。近年来，药理学相关研究表明，夏枯草具有抗肿瘤、抗感染、抗菌及抗病毒、抗氧化、降血脂、降血压、降血糖、调节免疫系统和调节呼吸系统等作用（邓子煜等，2012）。夏枯草由于其重要的临床应用和开发价值，成为一种具有潜力的药物资源。

有研究证明，药用植物内生菌具有合成与宿主植物相同或相似活性成分的功能，在生物防治、医药卫生等领域的应用潜力非常大（邓雪萍和杨博，2010）；但目前为止，尚未见有从夏枯草植株分离出内生芽胞杆菌的研究报道。为此，本研究对夏枯草植株不同部位的内生芽胞杆菌和夏枯草根际土壤芽胞杆菌进行了分离，以期了解夏枯草植株内及其根际土壤芽胞杆菌的分布和种类状况，以及它们之间的联系，为发掘和利用药用内生芽胞杆菌资源提供依据。研究方法如下。

二、研究方法

1）样品的采集。夏枯草植株及根际土壤采自武夷山国家自然保护区挂墩路口，采集时将夏枯草连根拔起，连同附着在根表的土壤一同装入无菌自封口塑料袋内，带回实验室进行分离。

2）主要仪器和试剂。LB 培养基：胰蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g、琼脂 17.5g，水 1000ml，pH7.0。NA 培养基：牛肉浸膏 3g、酵母浸膏 1g、蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、琼脂 17.5g，水 1000ml，pH 7.0。DNA 提取试剂：0.1mol/L NaCl，0.01mol/L Tris/HCl，0.001 mol/L EDTA。PCR 反应试剂：10×Buffer，dNTP（0.01 mol/L/each），*Taq* 酶（2.5U/μl）（上海博尚生物技术服务有限公司），100bp Marker（上海英骏生物技术有限公司）。仪器：VP GelDoc-It TS Imaging System 凝胶成像仪、华粤行仪器有限公司 T. Personal

Biometra 梯度 PCR 仪、PowerPac Basic BIO-RAD 电泳仪、离心机（eppendorf Centrifuge 5418R）。

3）采集夏枯草内生及根际土壤芽胞杆菌的分离与纯化。夏枯草内生菌的分离：将夏枯草植株洗净、晾干，分别从根部、茎部、叶部称取样品 1g，先用 75%乙醇处理 30s，然后放入 10%次氯酸钠处理 8min，再用无菌水漂洗 3 次；将漂洗后的植株样品置于无菌研钵内，加入 1ml 无菌水进行研磨，吸取 1ml 清液，加入装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-1} 浓度，80℃水浴 10min 后，再稀释至 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}，各取 100μl 稀释液涂于 LB 培养基平板上，每个梯度重复 3 次，30℃恒温箱内培养。

根际土壤芽胞杆菌的分离：用刮刀轻轻刮取附着在夏枯草根表的土壤，视为根际土壤；称取根际土壤 10g 至盛有 90ml 无菌水的三角瓶中，振荡 20min，80℃水浴 10min（每隔 5min 振荡一次）后，吸取 1ml 土壤悬液至装有 9ml 无菌水的试管，即配成 10^{-2} 浓度，再稀释至 10^{-3}、10^{-4}；各取 200μl 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 稀释液涂于 LB 平板上，每个梯度重复 3 次，30℃恒温箱内培养。

培养 2～3d 后，观察各平板上的菌落形态，根据菌落的大小、颜色、干湿、形状、边缘、透明度等特征区分不同的菌落并进行编号、计数，计算各样品同类菌落的数量及各样品的芽胞杆菌总含量。挑取形态不同的单菌落进行划线培养，直至获得纯培养，并用−80℃甘油冷冻法保藏。经上述试验，共获得芽胞杆菌 27 株，其具体信息见表 5-50。

表 5-50　分离自夏枯草植株及其根际土壤的菌株信息

序号	菌株编号	分离来源
1	FJAT-17207	夏枯草根际土壤
2	FJAT-17208	夏枯草根际土壤
3	FJAT-17209	夏枯草根际土壤
4	FJAT-17210	夏枯草根际土壤
5	FJAT-17211	夏枯草根际土壤
6	FJAT-17212	夏枯草根际土壤
7	FJAT-17213	夏枯草根际土壤
8	FJAT-17214	夏枯草根际土壤
9	FJAT-17215	夏枯草根际土壤
10	FJAT-17216	夏枯草根际土壤
11	FJAT-17217	夏枯草根部
12	FJAT-17218	夏枯草根部
13	FJAT-17219	夏枯草根部
14	FJAT-17220	夏枯草根部
15	FJAT-17221	夏枯草根部
16	FJAT-17222	夏枯草根部
17	FJAT-17223	夏枯草根部
18	FJAT-17224	夏枯草根部

续表

序号	菌株编号	分离来源
19	FJAT-17225	夏枯草根部
20	FJAT-17226	夏枯草茎部
21	FJAT-17227	夏枯草茎部
22	FJAT-17228	夏枯草茎部
23	FJAT-17229	夏枯草茎部
24	FJAT-17230	夏枯草茎部
25	FJAT-17231	夏枯草茎部
26	FJAT-17232	夏枯草叶部
27	FJAT-17233	夏枯草叶部

4）芽胞杆菌 DNA 的提取、扩增和测序。采用苯酚-氯仿法提取 DNA。采用细菌通用 16S rDNA 引物（Yoon *et al.*，1997）9F 5′-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3′（9-27）和 1542R 5′-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3′（1542-1525）进行 16S rDNA 序列扩增。PCR 反应体系（25μl）：2.5μl 10× Buffer、0.5μl 0.01mol/L dNTP、引物各 1μl、0.3μl（5U/μl）的 *Taq* 酶和 1μl DNA 模板，补充无菌水至 25μl。PCR 反应程序：94℃预变性 5min，94℃变性 30s，55℃退火 45s，72℃延伸 1min 30s，35 个循环，最后 72℃延伸 10min。PCR 产物的检测：取 2μl PCR 产物，点样于 1.5%的琼脂糖凝胶中，以 100bp Marker 作为标准分子质量，100V 电压，电泳 40min，EB 染色，用凝胶成像系统观察结果。PCR 产物由上海博尚生物技术有限公司进行测序，并将测得的序列进行序列比对分析。

5）芽胞杆菌的分类鉴定。依据《伯杰氏细菌系统学分类手册》（Logan and De Vos，2009）、东秀珠和蔡妙英（2001）编著的《常见细菌系统鉴定手册》和 Gordon 等（1973）的《芽胞杆菌属》，对分离到的 27 株芽胞杆菌进行形态特征观察，并结合 16S rDNA 序列比对结果，将其鉴定到种，确定其分类地位。

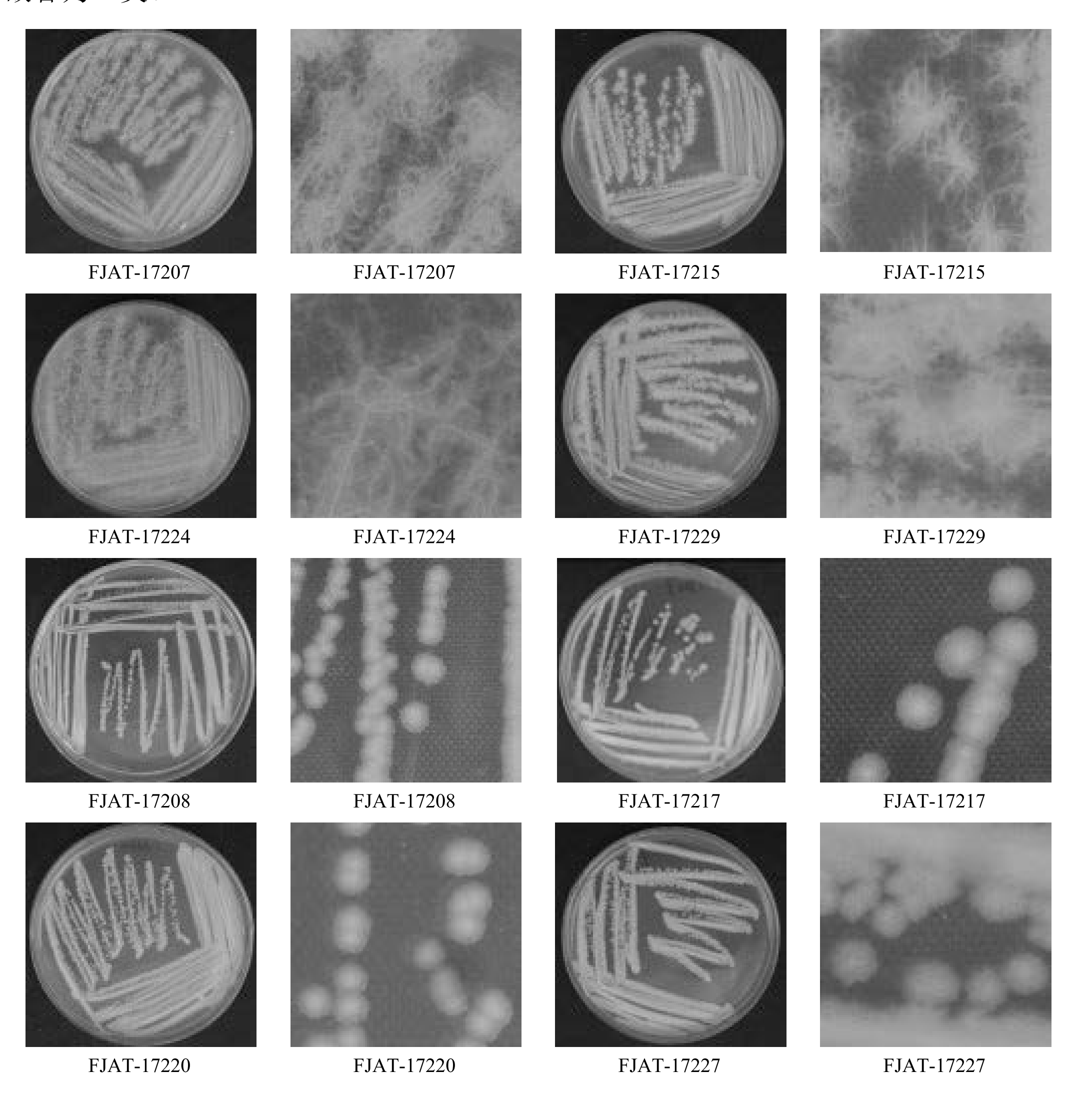
6）芽胞杆菌的系统发育分析。根据对 27 株芽胞杆菌的分类鉴定结果，选择相关的参考菌株 16S rDNA 序列，再经 ClustalX（Thompson *et al.*，1997）对齐后，用软件 Mega4.0（Tamura *et al.*，2007，2004）对 27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列进行聚类分析（方法为 Neighbour-Joining），构建聚类树。

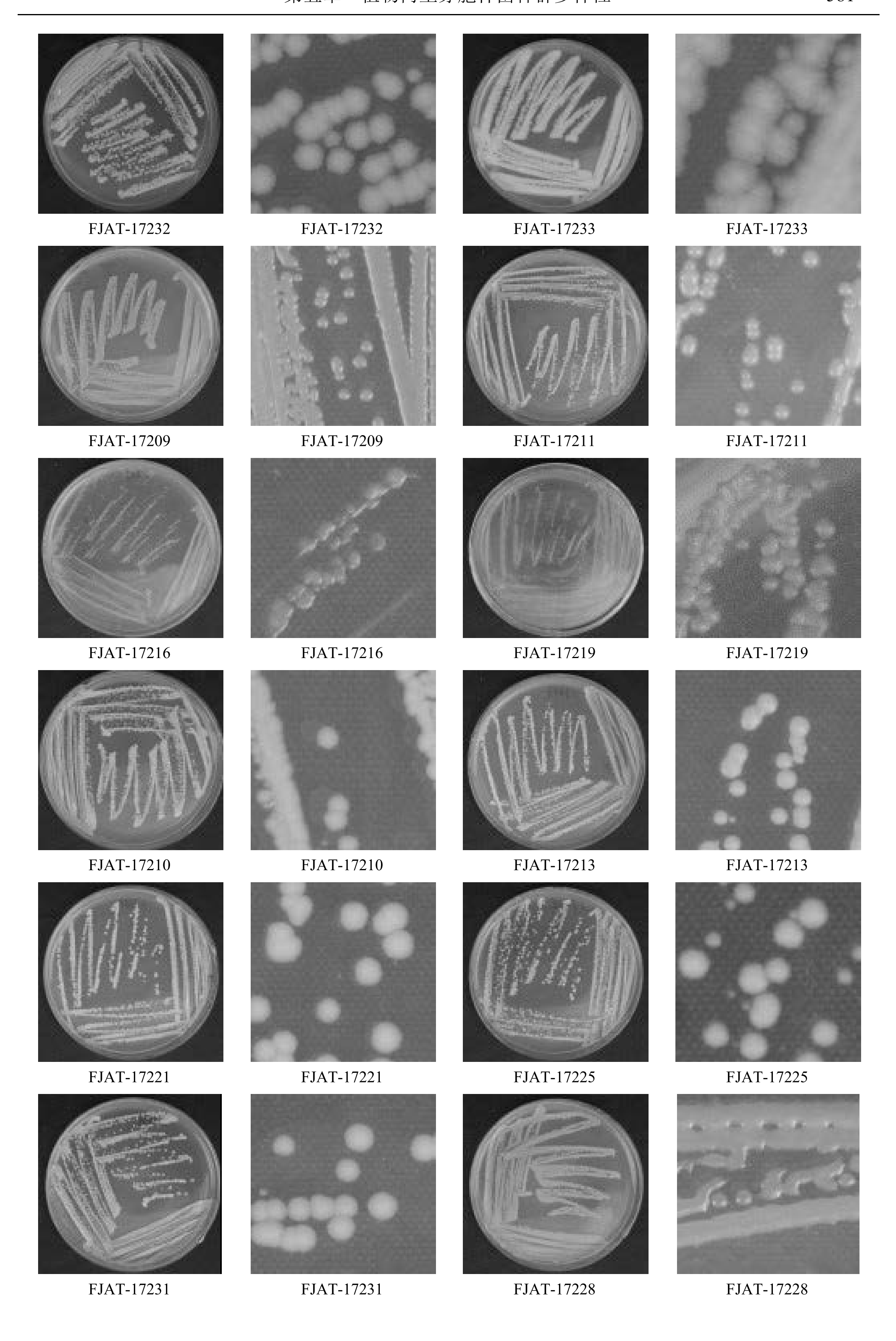
7）夏枯草植株及其根际土壤中芽胞杆菌含量的分析。根据对夏枯草植株及其根际土壤中芽胞杆菌的分离和种类鉴定的结果，对夏枯草植株不同部位及其根际土壤中芽胞杆菌的种类、数量及同种芽胞杆菌在不同样品中的含量进行统计，分析其分布规律。

三、夏枯草内生芽胞杆菌菌落形态

从夏枯草植株及其根际土壤中分离得到的 27 株芽胞杆菌，其菌落形态照片见图 5-12。根据菌落形态特征的不同，如菌落颜色、表面干湿、表面是否光滑、菌落高度、是否有光泽、边缘是否整齐及透明度等，对 27 株芽胞杆菌进行归类，大致可以分为

九大类：FJAT-17207、FJAT-17215、FJAT-17224 和 FJAT-17229 菌落白色，表面粗糙、扁平、无光泽、不透明，边缘羽毛状；FJAT-17208、FJAT-17217、FJAT-17220、FJAT-17227、FJAT-17232 和 FJAT-17233 菌落干燥、白色，表面粗糙、扁平、无光泽、不透明，边缘不整齐；FJAT-17209、FJAT-17211、FJAT-17216 和 FJAT-17219 菌落湿润、浅黄色，表面光滑、隆起、有光泽、不透明，边缘整齐；FJAT-17210、FJAT-17213、FJAT-17221、FJAT-17225 和 FJAT-17231 菌落圆形、湿润，表面光滑、无光泽，边缘整齐；FJAT-17218、FJAT-17226、FJAT-17228 和 FJAT-17230 菌落湿润，表面光滑、扁平、中部褶皱，边缘整齐；FJAT-17212、FJAT-17214、FJAT-17222 和 FJAT-17223 菌落很小、湿润，表面光滑、有光泽，边缘整齐，但两者的菌落颜色和透明度不同，故各为一类。





FJAT-17232　FJAT-17232　FJAT-17233　FJAT-17233

FJAT-17209　FJAT-17209　FJAT-17211　FJAT-17211

FJAT-17216　FJAT-17216　FJAT-17219　FJAT-17219

FJAT-17210　FJAT-17210　FJAT-17213　FJAT-17213

FJAT-17221　FJAT-17221　FJAT-17225　FJAT-17225

FJAT-17231　FJAT-17231　FJAT-17228　FJAT-17228

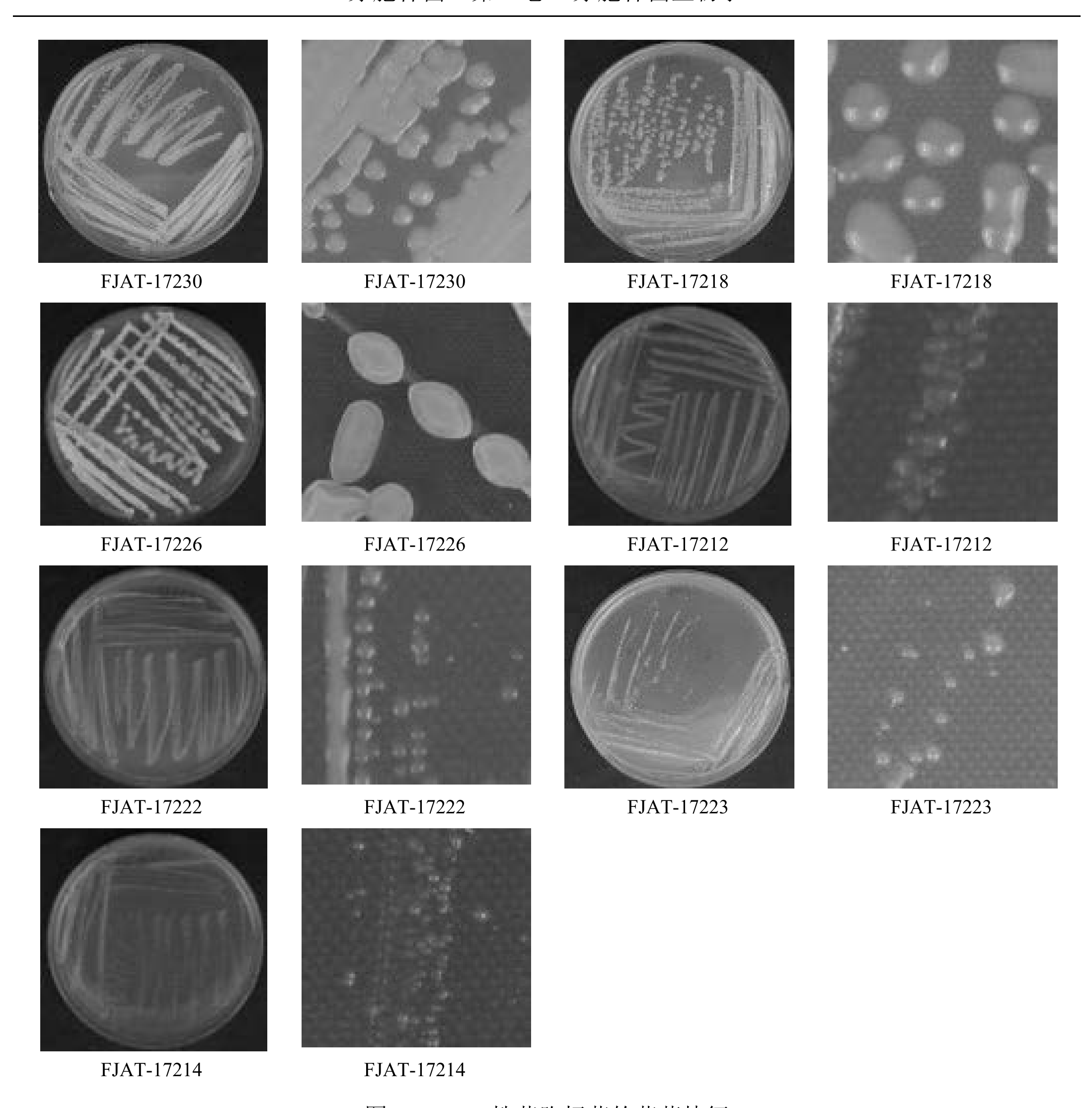


图 5-12　27 株芽胞杆菌的菌落特征

四、夏枯草内生芽胞杆菌种类鉴定

用 16S rDNA 通用引物对 27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增，将 PCR 产物直接进行测序，得出这 27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 基因部分序列。27 株芽胞杆菌的 16S rDNA 序列经 EzTaxon 在线比对，得到 27 株芽胞杆菌和参考菌株之间的同源性（表 5-51）。根据比对结果，可将这 27 株菌初步鉴定为 14 个种，即 FJAT-17210、FJAT-17213、FJAT-17221、FJAT-17225、FJAT-17231 为阿氏芽胞杆菌（*Bacillus aryabhattai*），FJAT-17208、FJAT-17211、FJAT-17227、FJAT-17223 为蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*），FJAT-17215、FJAT-17229、FJAT-17217、FJAT-17224 为炭疽芽胞杆菌（*B. anthracis*），FJAT-17218、FJAT-17226 为甲基营养型芽胞杆菌（*B. methylotrophicus*），FJAT-17220、FJAT-17232 为苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*），FJAT-17230 为嗜气芽胞杆菌 *B.*

aerophilus），FJAT-17228 为地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*），FJAT-17207 为假蕈状芽胞杆菌（*B. pseudomycoides*），FJAT-17223 为简单纯芽胞杆菌（*B. simplex*），FJAT-17214 为短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*），FJAT-17216 为球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*），FJAT-17209 为解木糖赖氨酸芽胞杆菌 *L. xylanilyticus*，FJAT-17222 为嗜几丁质类芽胞杆菌（*Paenibacillus chitinolyticus*），FJAT-17212 和 FJAT-17219 可能为芽胞杆菌属的新种。

表 5-51　27 株芽胞杆菌与参考菌株的 16S rDNA 同源性

编号	菌株	种	中文名称	16S rDNA 相似度/%
1	FJAT-17230	*B. aerophilus*	嗜气芽胞杆菌	100.0
2	FJAT-17215	*B. anthracis*	炭疽芽胞杆菌	99.86
3	FJAT-17217			99.86
4	FJAT-17224			99.57
5	FJAT-17229			99.75
6	FJAT-17210	*B. aryabhattai*	阿氏芽胞杆菌	100.0
7	FJAT-17213			100.0
8	FJAT-17221			99.33
9	FJAT-17225			100.0
10	FJAT-17231			99.84
11	FJAT-17208	*B. cereus*	蜡状芽胞杆菌	99.87
12	FJAT-17211			99.86
13	FJAT-17227			99.75
14	FJAT-17233			100.0
15	FJAT-17212	*B. galactosidilyticus*	-	96.81
16	FJAT-17228	*B. licheniformis*	地衣芽胞杆菌	99.41
17	FJAT-17218	*B. methylotrophicus*	甲基营养型芽胞杆菌	99.88
18	FJAT-17226			99.70
19	FJAT-17207	*B. pseudomycoides*	假蕈状芽胞杆菌	100.0
20	FJAT-17223	*B. simplex*	简单纯芽胞杆菌	99.88
21	FJAT-17220	*B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌	100.0
22	FJAT-17232			100.0
23	FJAT-17214	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	99.59
24	FJAT-17216	*L. sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌	97.69
25	FJAT-17209	*L. xylanilyticus*	解木糖赖氨酸芽胞杆菌	100.0
26	FJAT-17219	*L. xylanilyticus*	解木糖赖氨酸芽胞杆菌	96.26
27	FJAT-17222	*P. chitinolyticus*	嗜几丁质类芽胞杆菌	99.85

五、夏枯草内生芽胞杆菌系统发育

采用 Neighbour-Joining 方法构建聚类树，遗传距离为 0.02。从夏枯草植株及其根系土壤中分离到 27 株芽胞杆菌和 24 株参考菌株构建的 16S rDNA 进化树见图 5-13，由系统发育树可以得出 27 株菌均为芽胞杆菌，27 株芽胞杆菌主要分成 8 个类群。类群Ⅰ包含 11 株菌，由菌株 FJAT-17232、FJAT-17227、FJAT-17220、FJAT-17217、FJAT-17211、FJAT-17208、FJAT-17233、FJAT-17207、FJAT-17224、FJAT-17229、FJAT-17215 组成；类群Ⅱ包含 4 株菌，由菌株 FJAT-17230、FJAT-17228、FJAT-17218、FJAT-17226 组成；类群Ⅲ包含包含 5 株菌，由菌株 FJAT-17210、FJAT-17213、FJAT-17221、FJAT-17231、FJAT-17225 组成；类群Ⅳ包含包含 3 株菌，由菌株 FJAT-17216、FJAT-17209、FJAT-17219 组成；类群Ⅴ包含 1 株菌，即 FJAT-17223；类群Ⅵ包含 1 株菌，即 FJAT-17212；类群Ⅶ包含 1 株菌，即 FJAT-17214；类群Ⅷ包含 1 株菌，即 FJAT-17222。

六、夏枯草不同部位内生芽胞杆菌种类分布

从表 5-52 可以看出，从根系土壤所分离出的芽胞杆菌种类最多，有 9 种：*Bacillus anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*、*B. galactosidilyticus*、*B. pseudomycoides*、*Brevibacillus brevis*、*L. sphaericus*、*L. xylanilyticus*、*Bacillus thuringiensis*。其次是根部组织，有 7 种：*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. methylotrophicus*、*B. simplex*、*B. thuringiensis*、*L. xylanilyticus*、*P. chitinolyticus*。再次是茎部组织，有 6 种：*B. aerophilus*、*B. anthracis*、*B. aryabhattai*、*B. cereus*、*B. licheniformis*、*B. methylotrophicus*。叶部组织最少，只有 1 种：*B. cereus*。

表 5-52　夏枯草不同部位及根系土壤中分离到的芽胞杆菌种类及数量

样本名称	菌种名	含量/（$\times10^4$ CFU/g）
根系土壤	*Bacillus anthracis*	0.37
	B. aryabhattai	2.33
	B. cereus	9.07
	B. galactosidilyticus	0.33
	B. pseudomycoides	0.97
	Brevibacillus brevis	2.00
	L. sphaericus	0.07
	L. xylanilyticus	2.07
	Bacillus thuringiensis	2.37
根部组织	*B. anthracis*	17.67
	B. aryabhattai	1.53
	B. methylotrophicus	7.00
	B. simplex	0.10
	B. cereus	5.67
	L. xylanilyticus	2.00

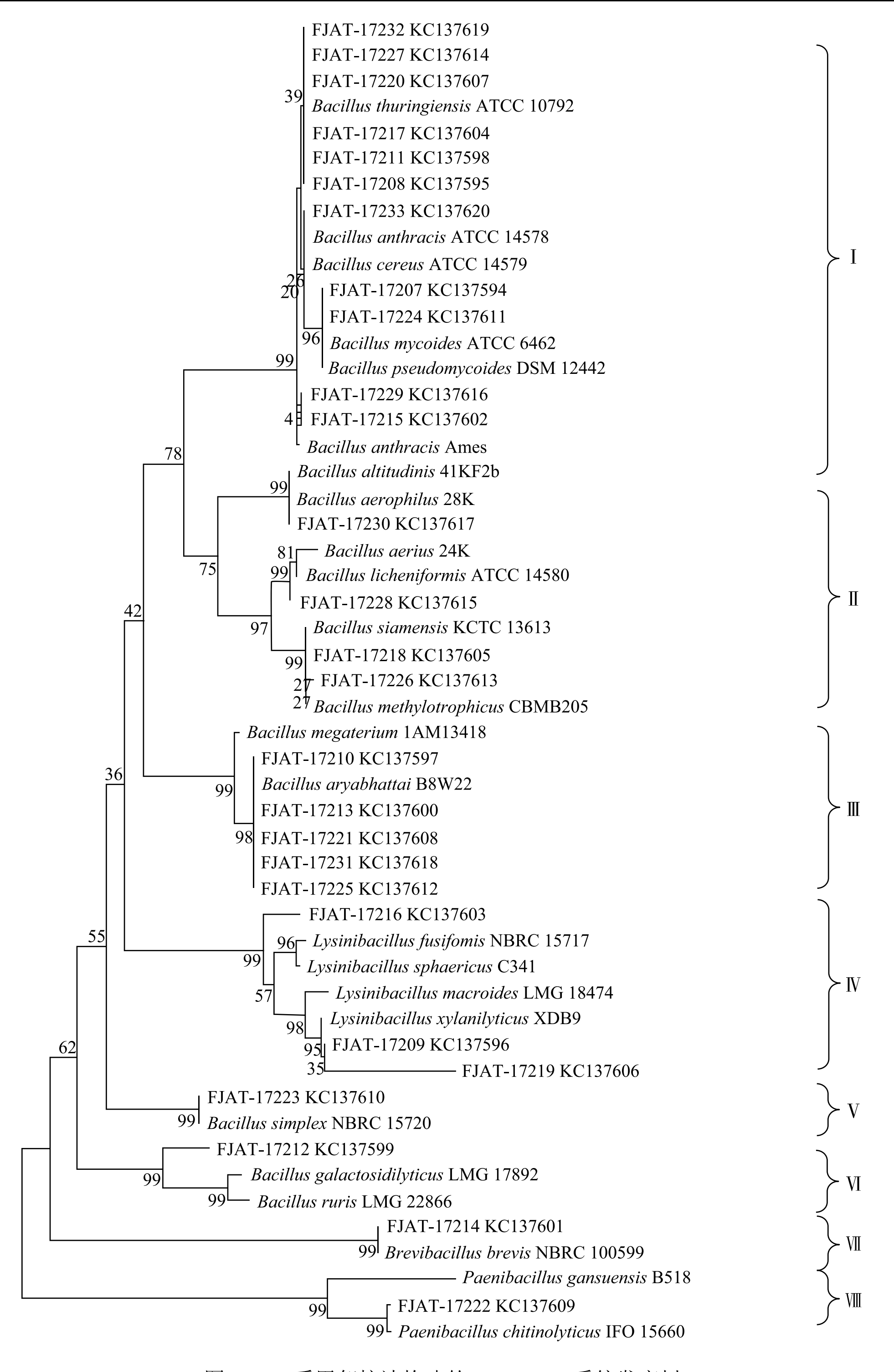


图 5-13　采用邻接法构建的 16S rDNA 系统发育树

续表

样本名称	菌种名	含量/（$\times 10^4$ CFU/g）
根部组织	*P. chitinolyticus*	1.67
茎部组织	*B. aerophilus*	0.53
	B. anthracis	0.07
	B. aryabhattai	0.03
	B. cereus	1.17
	B. licheniformis	0.03
	B. methylotrophicus	0.67
叶部组织	*B. cereus*	5.07

七、夏枯草不同部位内生芽胞杆菌数量的分布

从图 5-14 可以看出，根部组织中所含的芽胞杆菌数量最多，为 35.64×10^4CFU/g，其次是根系土壤（19.58×10^4CFU/g）、叶部组织（5.07×10^4CFU/g），茎部组织中的芽胞杆菌数量最少，仅有 2.50×10^4CFU/g。

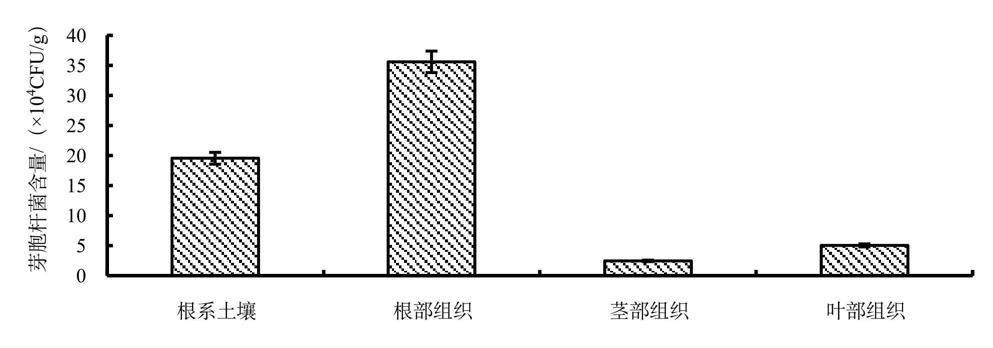


图 5-14　夏枯草不同部位芽胞杆菌总含量比较图

八、内生芽胞杆菌在夏枯草不同部位的分布

从表 5-53 可以看出，*Bacillus aerophilus* 和 *B. licheniformis* 只分布于茎部组织，含量分别为 0.53×10^4CFU/g、0.03×10^4CFU/g，*B. simplex* 和 *P. chitinolyticus* 只分布于根部组织，含量分别为 0.10×10^4CFU/g、1.67×10^4CFU/g，这 4 种芽胞杆菌可能是夏枯草内生菌；*B. anthracis* 分布于根系土壤、根部组织和茎部组织中，含量分别为 0.37×10^4CFU/g、17.67×10^4CFU/g、0.07×10^4CFU/g，根部组织中含量最多；*B. aryabhattai* 分布于根系土壤、根部组织和茎部组织中，含量分别为 2.33×10^4CFU/g、1.53×10^4CFU/g、0.03×10^4CFU/g，在叶部组织中没有分布 ；*B. cereus* 在根系土壤、根部组织、茎部组织和叶部组织中均有分布，含量分别为 9.07×10^4CFU/g、5.67×10^4CFU/g、1.17×10^4CFU/g、5.07×10^4CFU/g；*B. methylotrophicus* 分布于根部组织和茎部组织中，含量分别为 7.00×10^4CFU/g 和 0.67×10^4CFU/g，在根系土壤和叶部组织中没有，可能是夏枯草内生菌；*B. galactosidilyticus*、

B. pseudomycoides、*B. thuringiensis*、*Brevibacillus brevis* 和 *L. sphaericus* 只分布于根系土壤，含量分别为 0.33×10^4CFU/g、0.97×10^4CFU/g、2.37×10^4CFU/g、2.00×10^4CFU/g、0.07×10^4CFU/g，在植物组织内没有分布；*L. xylanilyticus* 分布于根系土壤和根部组织，含量分别为 2.07×10^4CFU/g、2.00×10^4CFU/g，在茎部组织和叶部组织中没有分布。

表 5-53 同种芽胞杆菌在植株不同部位的含量

种名	样品部位芽胞杆菌含量/（$\times10^4$CFU/g）			
	根系土壤	根部组织	茎部组织	叶部组织
Bacillus aerophilus	0	0	0.53	0
B. anthracis	0.37	17.67	0.07	0
B. aryabhattai	2.33	1.53	0.03	0
B. cereus	9.07	5.67	1.17	5.07
B. galactosidilyticus	0.33	0	0	0
B. licheniformis	0	0	0.03	0
B. methylotrophicus	0	7.00	0.67	0
B. pseudomycoides	0.97	0	0	0
B. simplex	0	0.10	0	0
B. thuringiensis	2.37	0	0	0
Brevibacillus brevis	2.00	0	0	0
L. sphaericus	0.07	0	0	0
L. xylanilyticus	2.07	2.00	0	0
P. chitinolyticus	0	1.67	0	0

用类平均法进行聚类。如图 5-15 所示，在欧氏距离为 5 时，14 种芽胞杆菌可以分为 4 类。第 1 类包含 5 种菌：*Bacillus pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*Brevibacillus brevis*、*L. sphaericus* 和 *Bacillus galactosidilyticus*，5 种芽胞杆菌均只分布于根系土壤中。第 2 类包含 3 种菌：*B. aryabhattai*、*L. xylanilyticus* 和 *B. cereus*，3 种芽胞杆菌都在根系土壤和根部组织中有分布。第 3 类包含 4 种菌：*B. simplex*、*P. chitinolyticus*、*B. anthracis* 和 *B. methylotrophicus*，主要分布在根部组织中。第 4 类包含两种菌：*B. aerophilus* 和 *B. licheniformis*，两种芽胞杆菌均只分布于茎部组织。

九、讨论

芽胞杆菌属是一类产生芽胞的革兰氏阳性菌，菌体呈杆状，直或近直，大小为（0.3～2.2）μm×（2.1～7.0）μm；多数运动；鞭毛典型侧生；形成抗热内生孢子，在一个孢子囊中，胞子不多于一个；营好氧或兼性厌氧生活（布坎南和吉本斯，1984）。本节采用稀释涂布平板法，首次从夏枯草标本及其根系土壤中分离到了 27 株芽胞杆菌，结合形态特征和 16S rDNA 鉴定结果，将 27 株分离菌鉴定为 14 种芽胞杆菌，其中两株分离菌株

为芽胞杆菌疑似新种，这丰富了极端环境下芽胞杆菌分布踪迹，也为芽胞杆菌资源的应用提供新的选择途径。

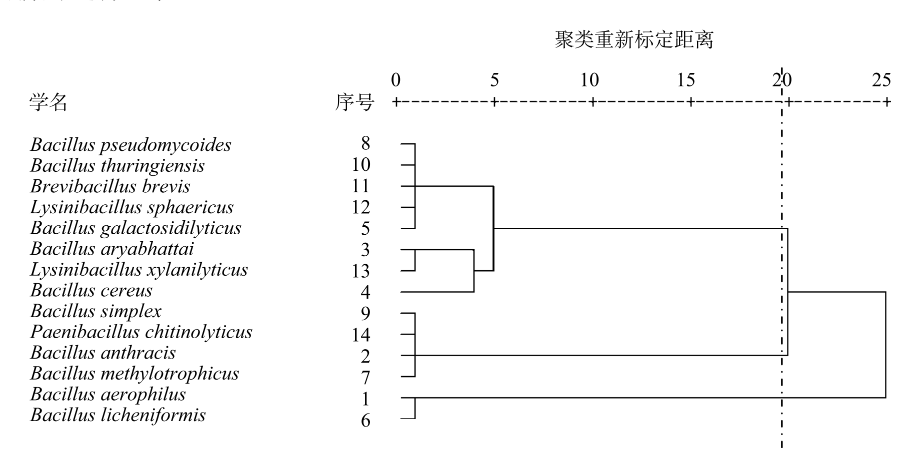


图 5-15　以种类为样本的夏枯草不同部位芽胞杆菌聚类分析图

rDNA 进化速度十分缓慢，具有高度保守性，被称为细菌的“活化石”。核糖体 16S rDNA 为所有细菌所共有，其基因大小适中（约 1.5kb），同时具有保守性和变异性，既能反映物种间的亲缘关系，又能揭示物种的特征核酸序列，并且能通过测序技术快速得到核酸序列，已成为理想的基因鉴定靶序列（都立辉和刘芳，2006）。根据 16S rDNA 的芽胞杆菌系统发育分析，27 株芽胞杆菌主要分成八个类群。从夏枯草根系土壤所分离出的芽胞杆菌种类最多（9 种），其次是根部组织（7 种），再次是茎部组织（6 种），叶部组织最少（1 种）。夏枯草根部组织中所含的芽胞杆菌数量最多，其次是根系土壤、叶部组织，茎部组织中的芽胞杆菌数量最少。*Bacillus pseudomycoides*、*B. thuringiensis*、*Brevibacillus brevis*、*L. sphaericus* 和 *Bacillus galactosidilyticus* 均只分布于根系土壤中；*B. aryabhattai*、*L. xylanilyticus* 和 *B. cereus* 在根系土壤和根部组织中有分布；*B. simplex*、*P. chitinolyticus*、*B. anthracis* 和 *B. methylotrophicus*，均主要分布在根部组织中；*B. aerophilus* 和 *B. licheniformis* 均只分布于茎部组织。

第九节　仙草内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

芽胞杆菌属的许多种分离于植物的内生组织，例如，*B. endophyticus* 分离于棉花内部组织（Reva *et al.*，2002）、*B. endoradicis* 分离于大豆根部（Zhang *et al.*，2012）、*B. graminis* 分离于沿海沙丘植物（Bibi *et al.*，2011）。植物内生菌与植物生长抑制病原菌有一定的相关性（Liu *et al.*，2009）。截至目前，尚未见有从仙草植株分离出内生芽胞杆菌的研究报道。仙草（*Mesona chinensis*），又名仙人草、凉粉草、黑豆腐草、薪草等（刘晓庚和陈梅梅，2004；杨敏，2002），为唇形科仙草属草本植物，全草利用。本研究对存在于仙草各组织中可培养的内生芽胞杆菌进行了分离与鉴定，得到了仙草植株内生芽胞杆

菌的分布及种属多样性结果，研究方法如下。

二、研究方法

1）仙草植株样品的采集。仙草采自福建省福州市福清市东张镇岭下村，采样时间为2012年5月，分别采集其不同器官（根、茎、叶），采集当天带回实验室进行内生菌分离。

2）主要试剂和仪器。PCR仪及电泳仪均为Bio-Rad公司产品，DNA提取扩增所用试剂为上海生工生物工程技术有限公司产品，其余试剂均为国产分析纯试剂。

3）仙草可培养内生芽胞杆菌的分离及鉴定。分离培养基采用NA培养基（牛肉浸膏3g、NaCl 5g、蛋白胨10g、琼脂15g/L），随机挑选根、茎、叶各1g，洗净风干，根部、茎基部、茎部和叶片分别先用75%乙醇处理30s后，放入10%次氯酸钠处理8min，再用无菌水漂洗3次。取最后一次的无菌水洗液涂于相应平板上，以检测表面消毒是否彻底。取上述消毒彻底样品进行研磨，用无菌水梯度稀释至10^{-3}。取上述样品稀释涂液，涂布分离平板，每一梯度重复3次，30°C培养24h 。挑取单菌落划线接种于NA培养基上培养。采用16S rRNA序列相似性分析方法对仙草可培养芽胞杆菌进行鉴定。PCR扩增：PCR扩增体系为25μl：10×Buffer 2.5μl，dNTP Mixture（10mmol/L）0.5μl，引物各1.0μl，*Taq* DNA酶（2.5U/μl）0.3μl，DNA 1.0μl，ddH_2O 18.7μl。采用细菌通用16S rRNA引物9F 5′-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′（9-27）和1542R 5′-AGAAAGGAGGTGATCCAG CC-3′（1542-1525），引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应条件为94°C预变性180s，94°C变性30s，55°C退火45s，72°C复性90s，72°C延伸600s，35个循环。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。芽胞杆菌生防菌的16S rRNA和ITS序列由上海生工生物工程有限公司进行测序。提取上述培养物基因组DNA，对从同一器官内分离到的16S rRNA序列完全相同的菌株，根据其菌落颜色、大小、突起特征、边缘特征、表面度和透明度等肉眼可辨的特征合并冗余。对所测序列用EzTaxon（http://eztaxon-e.ezbiocloud.net）（Kim *et al.*，2012）在线软件进行相似性分析，将其所对应的菌株鉴定到种属。

4）基于16S rRNA的仙草可培养内生芽胞杆菌的系统发育分析。所得序列经NCBI进行Blast比对后，再经ClustalX（Thompson *et al.*，1997）对齐后，用软件Mega4.0（Jukes and Cantor，1969；Felsenstein，1985；Saitou and Nei，1987；Tamura *et al*，2011）进行聚类分析（方法为Neighbour-Joining，Nucleotide：Jukes-Cantor），构建聚类树。

5）仙草芽胞杆菌的多样性分析。多样性指数（H’）的计算公式为：

$$H = -\sum_{i=1}^{S} p_i \ln p_i$$

式中，$p_i=N_i/N$，其中N_i为器官某物种的个体数，N为个体总数，S为脂肪酸生物标记的个数。

三、仙草内生芽胞杆菌的分离与鉴定

仙草根、茎、叶和果实各器官经表面消毒后，用最后一次冲洗的无菌水接种于相同

的分离平板上，结果均未见细菌生长，表明表面消毒彻底，后续试验分离到的细菌为仙草可培养内生细菌。通过上述方法从仙草植株根、茎、叶中共分离出 58 株芽胞杆菌，其中根部 29 株，茎部 28 株，叶部 1 株。多样性指数分析发现根部可培养芽胞杆菌多样性指数明显高于茎叶，叶中多样性指数最低（表 5-54）。

表 5-54　仙草植株内生可培养芽胞杆菌

来源	属	分离菌株数	丰富度	多样性指数
根	芽胞杆菌属	29	9	0.7343
	类芽胞杆菌属			
	赖氨酸芽胞杆菌属			
茎	芽胞杆菌属	28	2	0.3010
叶	芽胞杆菌属	1	1	0

58 株芽胞杆菌的 16S rRNA 序列 GenBank 登录号为：KF184021～KF184028、JN874780～JN874786、JX262263。经比对分析发现，58 株芽胞杆菌归属于 3 个属，分别为芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属和赖氨酸芽胞杆菌属。根部分离得到的可培养芽胞杆菌属于以上 3 个属，茎、叶分离的芽胞杆菌均为芽胞杆菌属的种类（表 5-55）。按与相应种模式菌株对应序列相似性大于 99%即可认为是同种的原则可知，仙草植株各器官共分离到芽胞杆菌 11 个种，分别为 *B. aryabhattai*、*B. simplex*、*B. aerophilus*、*B. cereus*、*Bacillus* sp.、*B. tequilensis*、*P. elgii*、*Lysinibacillus*. sp.、*B. pseudomycoides*、*B. flexus*、*B. endophyticus*（表 5-55），其中 FJAT-13978、FJAT-13982 和 FJAT-13985 的 16S rRNA 相似性低于 98%，有可能为芽胞杆菌属的新种，需进一步进行分类试验验证。

表 5-55　仙草中可培养微生物 16S rRNA 序列比对分析

菌株编号	科名	种名	来源	相似性/%	登录号
FJAT-13972 （KF184021）	Bacillaceae	*B. aryabhattai*	根	100	EF114313
FJAT-13973 （JN874780）	Bacillaceae	*B. simplex*	根	100	AB363738
FJAT-13974 （JN874781）	Bacillaceae	*B. aerophilus*	根	100	AJ831844
FJAT-13975 （JN874782）	Bacillaceae	*B. simplex*	根	99.67	AB363738
FJAT-13977 （JN874783）	Bacillaceae	*B. cereus*	根	100	AE016877
FJAT-13978 （KF184022）	Bacillaceae	*B. drentensis*	根	97.35	AJ542506
FJAT-13979 （JN874784）	Bacillaceae	*B. aerophilus*	根	100	AJ831844
FJAT-13980 （KF184023）	Bacillaceae	*B. tequilensis*	根	99.47	HQ223107
FJAT-13981 （KF184024）	Paenibacillaceae	*P. elgii*	根	99.57	AY090110
FJAT-13982 （KF184025）	Bacillaceae	*L. sphaericus*	根	93.98	CP000817
FJAT-13983 （JN874785）	Bacillaceae	*B. pseudomycoides*	根	100	ACMX01000133
FJAT-13984 （KF184026）	Bacillaceae	*B. simplex*	根	99.83	AB363738

续表

菌株编号	科名	种名	来源	相似性/%	登录号
FJAT-13985 （JX262263）	Bacillaceae	*B. drentensis*	根	98.15	AJ542506
FJAT-13986 （JN874786）	Bacillaceae	*B. flexus*	茎	100	AB021185
FJAT-13989 （KF184027）	Bacillaceae	*B. endophyticus*	茎	99.06	AF295302
FJAT-13991 （KF184028）	Bacillaceae	*B. endophyticus*	叶	100	AF295302

四、仙草内生芽胞杆菌的系统发育

由图 5-16 可以看出，基于 16S rRNA 序列相似性分析，可将从仙草植株根、茎、叶分离得到的 58 株可培养芽胞杆菌分为 A～G 7 个类群。其中 *B. endophyticus* 同时在茎、叶中分离到。其中，C 群包含 5 株菌（FJAT-13972～FJAT-13975、FJAT-13986），分离于根部和茎部，为芽胞杆菌属的阿氏芽胞杆菌 *B. aryabhattai*、简单芽胞杆菌 *B. simplex* 和 *B. flexus*，分别为 12 株、6 株和 14 株，占分离总数的 62%，可见这 3 个种为代表的可培养内生芽胞杆菌是仙草内生环境中的优势菌。A 群包含两株菌（FJAT-13981 和 FJAT-13982），分离于根部，分别属于类芽胞杆菌属和赖氨酸芽胞杆菌属。B 群包含两株菌（FJAT-13978 和 FJAT-13985），分离于根部，可能是芽胞杆菌属的新种。D 群包含两株菌（FJAT-13977、FJAT-13983），分离于根部，为芽胞杆菌属的蜡状芽胞杆菌。E 群包含一株菌（FJAT-13980），分离于根部，为芽胞杆菌属的 *B. tequilensis*。F 群包含 2 株菌（FJAT-13974、FJAT-13979），分离于根部，为芽胞杆菌属的种，与 *B. aerophilus* 最相近。H 群包含两株菌（FJAT-13989、FJAT-13991），为同一种，分别分离于茎部和叶部。

五、仙草内生芽胞杆菌种类的相关性分析

根据 16S rRNA 序列分析结果，仙草植株根茎内生可培养芽胞杆菌的种类数量完全不同，没有共同种类，茎叶有共同的种类。这说明茎叶内的可培养芽胞杆菌不是由根部转移而来，可能通过其他途径，如空气、雨水等。叶部分离到的芽胞杆菌种类 *B. endophyticus* 与茎部的部分相同，说明 *B. endophyticus* 可能由茎部转移而来，也可能来自空气。

六、讨论

可培养法及免培养法均可用于植物内生细菌的区系研究，通常认为免培养法可覆盖更多的细菌种属，广泛用于植物微生态研究（刘琳等，2009）。但可培养细菌相对于不可培养细菌而言，具有更好的潜在应用价值，故本研究讨论仙草可培养内生细菌。据文献报道，目前尚未见关于仙草植株内生芽胞杆菌种群多样性研究的报道。

在对分离所得到的仙草植株可培养内生芽胞杆菌进行鉴定时，本研究采用了常用细菌鉴定方法 16S rRNA 序列鉴定法。根据鉴定结果，仙草植株内生芽胞杆菌存在多样性（共有 3 个属 11 个种）。

从仙草可培养内生芽胞杆菌的种属分布来看，*Lysinibacillus* 属细菌作为内生菌仅在

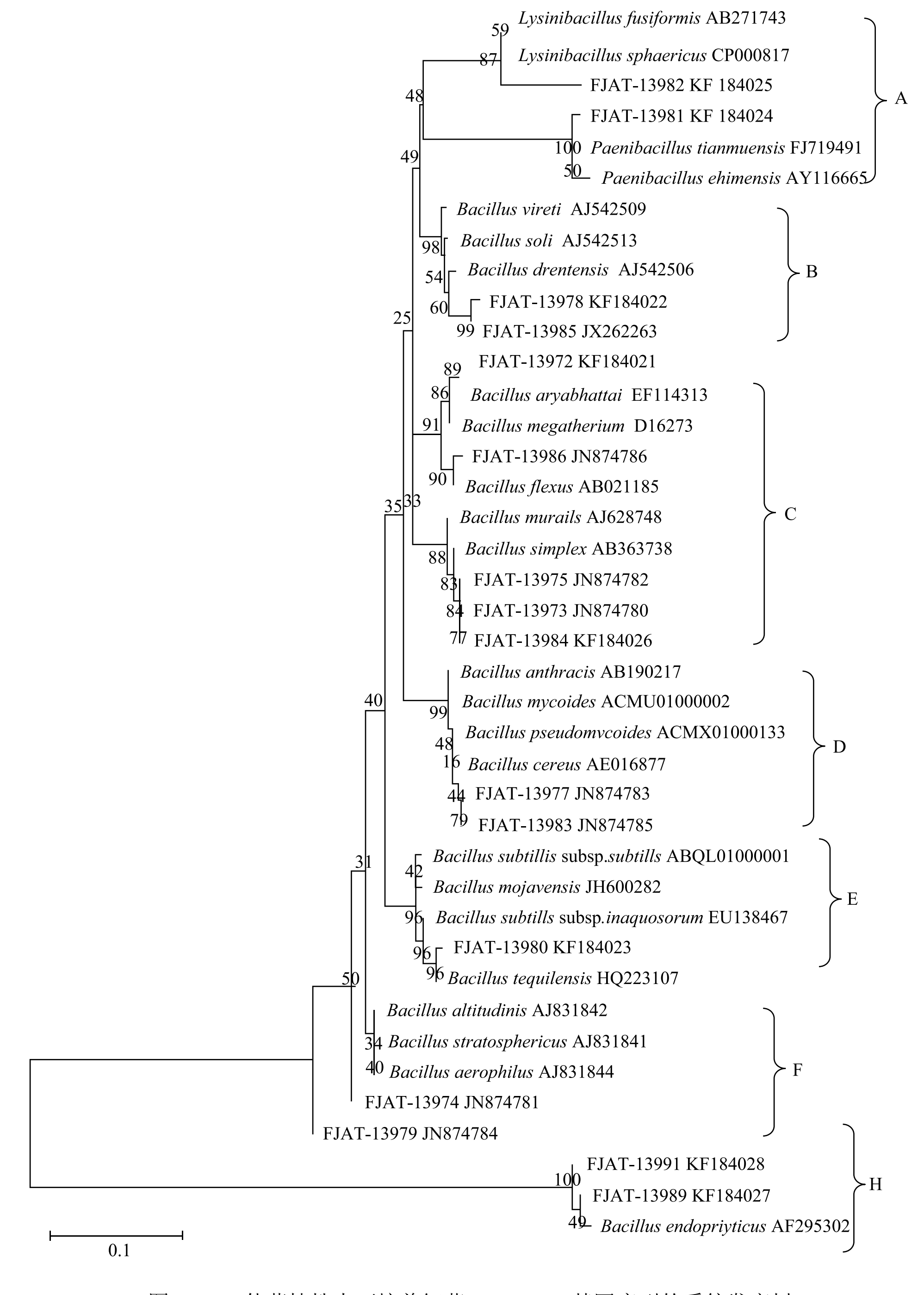


图 5-16　仙草植株内可培养细菌 16S rRNA 基因序列的系统发育树

3 种植物中被分离到（游玲等，2012），本节在仙草根部分离到一株 *Lysinibacillus* sp.，丰富了该属细菌在植物内生细菌中的种类。仙草植株内分离到的其他芽胞杆菌种类均属于植物组织常见的内生细菌（殷幼平等，2012；孙占斌等，2012）。

仙草植株不同器官的可培养内生芽胞杆菌的种类具有不同程度的相似性，这种相似性在一定程度上揭示了仙草植株可培养内生芽胞杆菌的来源及其在植株内部的迁移过程。本研究获得了丰富的芽胞杆菌资源，为进一步的应用研究提供了材料。

第十节　龙眼内生芽胞杆菌种群多样性

一、概述

Pasteur（1876）从无菌葡萄果汁中分离出内生细菌，内生细菌由此逐渐受到了人们广泛的关注（刘云霞，1994）。人们发现植物体内存在大量有益的内生细菌和内生真菌，部分内生菌在植物体内能产生多种生物学作用，可以提供植物所需要的营养物质如固氮（Reinhold-Hurek *et al.*，1993）（内生共生固氮），促进植物生长（Sturz *et al.*，1997）或诱导植物抗病性等（Sturz *et al.*，1996）。病原菌侵染使果蔬遭受很大的迫害。为了减少病害的发生，目前使用较多的还是化学药剂（Eckert and Ogawa，1985），但化学药剂残留对人体健康及环境存在不良影响，世界卫生组织已禁止一些化学药剂的使用，如多菌灵、双胍盐等。近年来，国内外学者对生物防治给予很大关注。拮抗细菌由于培养方便，作为抗生素的新来源之一，日益引起人们的注意。有益微生物的积极作用为以后果蔬的生物防治提供了一条新的途径。马利平等（2006）报道芽胞杆菌 B96-II 对黄瓜枯萎病、西瓜枯萎病、青椒枯萎病有显著防治效果。康金花等（2007）从茄子、麦子、刀豆、玉米根际土样中，筛选对瓜类枯萎镰刀菌有拮抗作用的细菌菌株。李亚珍等（2004）将生防菌剂用于甜瓜保鲜的研究，结果表明，甜瓜采后用生防剂 BG2、CPF10 溶液浸泡，与用低毒的化学杀菌剂 BG1、好力克溶液浸泡同样可以增加瓜储藏期间的商品率。研究方法如下。

二、研究方法

1）供试龙眼品种。供试龙眼品种为‘福眼’、‘松风本’和‘石硖’，采自福建泉州市农业科学研究所龙眼果园和莆田市城厢区华亭镇龙眼种植区，采集时间为 2008 年 8 月和 2009 年 8～10 月。

2）微生物分离培养基的配制。NA 培养基：牛肉浸膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、琼脂 18g，pH7.2。NB 培养基：牛肉浸膏 3.0g、蛋白胨 10.0g、NaCl 5.0g、pH7.0～7.2。PDA 培养基（钱存柔和黄仪秀，1999）：马铃薯（去皮）200g、琼脂 15～20g、蔗糖 20g、水 1000ml。配制方法如下：将去皮的马铃薯切成小块，放入 1500ml 的锅中煮沸 25min，然后用双层纱布过滤，滤液加入琼脂和糖，定容至 1000ml，pH 自然。

3）脂肪酸鉴定。脂肪酸鉴定见第五章第三节。

4）ITS 测序。待测菌株：3308、3309、3340、3311、3312，*Taq* Reaction 10×Buffer，dNTP mix （dATP、dCTP、dGTP、dTTP 每个 10mmol/L），*Taq* 酶。以上试剂来自北京天为时代科技有限公司。

5）龙眼果实内生菌的分离与纯化。龙眼采摘后从不同品种中选取没有被病虫害侵染

的健康果实，放入冷藏箱带回实验室，4℃冰箱保存备用。

取不同品种龙眼果皮、果肉各 5g，75%乙醇中浸泡 30s，然后用 10%次氯酸钠消毒 5min，无菌水漂洗 3 次。用灭菌的滤纸吸干水分，加入 45ml 无菌水于榨汁机中榨成匀浆。移取研磨液采用系列浓度梯度稀释法进行稀释，稀释成 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}，每个处理重复 3 次。每个稀释度的菌液 0.2ml 均匀地涂布于 NA 及 PDA 培养基的平板上，NA 平板置于 30℃人工气候箱中培养 24h，PDA 培养基的平板于 28℃人工气候箱中培养，48～72h 后观察计数。

6）龙眼果实腐烂致腐菌的分离纯化与鉴定。从莆田地区采集的‘福眼’，采集时间为 2008 年 8 月 25 日，对龙眼果实进行不同腐烂程度的分级，从果皮和果肉中分离致腐菌。龙眼果实腐烂致腐菌的分离方法：具体分离方法同内生菌分离方法。腐烂致腐菌的脂肪酸鉴定：脂肪酸提取参照 MIDI 操作手册，参见第五章第三节。部分腐烂致腐菌的 ITS 鉴定如下。①生化试剂：试验中所用的引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列：采用引物 ITS4 和 ITS5 合成引物，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。ITS4 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′，ITS5 5′-GGAAGTAAAAGTC GTAAC AAGG-3′。②DNA 提取：尿素法提取真菌 DNA。③PCR 扩增：PCR 反应体系（25μl）：Buffer 2.5μl，dNTP 0.2μl，引物 ITS4 1μl，引物 ITS5 1μl，*Taq* 0.25μl，ddH_2O 19.05μl，DNA 模板 1μl。PCR 扩增条件：94℃变性 5min；30 个循环，94℃变性 60s，56.0℃复性 60s，72℃延伸 60s；72℃最终延伸 10min。④琼脂糖凝胶电泳：1.5%琼脂糖凝胶，加入 0.3μl/ml GELview 染料，每孔载样 8μl，同时加入 100bp Marker ladder。作为分子质量对照，110V 左右，电泳 35min 左右，紫外线下观察并拍照。⑤序列测定：取 40μl PCR 产物和 40μl 的 ITS4 和 ITS5，送至上海英俊生物技术有限公司。⑥ITS 区序列分析：测序结果中每个样品的双向序列用 DNAman version 6.0 软件中 Seqence Assembly 进行拼接并输出全序列，将获得的序列与 GenBank 核酸序列数据库进行同源序列比对分析，用 DNAman version 6.0 软件对 7 个菌株的序列进行多重比较及聚类分析。

7）龙眼保鲜功能微生物的筛选。供试生防菌株分别来源于健康龙眼果实分离的内生菌、胡柚果皮和果肉中分离的内生菌及福建省农业科学院生态研究所牧草品种资源谱采集的牧草根际土壤中分离的芽胞杆菌。

龙眼保鲜功能微生物的初步筛选。①致腐菌培养：将病原菌活化于 NA 琼脂平板上，在 30℃条件下培养 48h，挑取单菌落于装有 25ml NA 培养液的 250ml 三角瓶中，于 30℃，200r/min 摇床培养 48h。拮抗细菌的培养：将待筛选拮抗菌株活化于 NA 培养基上，置于 30℃条件下培养 48h。②拮抗细菌的初步筛选：采用划线法首先将 NA 培养基在培养皿中倒入薄薄一层，将 NA 培养液中培养的病原菌发酵液混成菌悬液培养基，倒入已经有一层 NA 培养基的培养皿中静置，晾干。挑取待筛选拮抗菌株在倒有混合菌悬液的培养基上划一条短线，每平板可以划 4 个菌株，每菌株两个重复。

龙眼保鲜功能微生物的复筛。①菌液的制备：将病原菌划线于 NA 培养基上，置于 30℃条件下培养 48h；将拮抗菌划线于 NA 培养基上，置于 30℃条件下培养 48h。分别挑取病原菌单菌落于装有 25ml NA 培养液的 250ml 三角瓶中，置于 30℃，200r/min 摇床培养 48h，每株病原菌 3 个处理。分别挑取拮抗菌单菌落于装有 25ml NB 培养液的 250ml

三角瓶中，置于 30℃，170r/min 摇床培养 48h。②牛津杯法：首先将 NA 培养基在培养皿中倒入薄薄一层，将 NB 培养液中培养的病原菌发酵液吸取 1ml 于 0.7% NA 培养基中，混成菌悬液培养基，倒入已经有一层 NA 培养基的培养皿中静置，晾干。将已灭菌的牛津杯用无菌镊子放到培养基上，每个培养皿放 4 个牛津杯。拮抗菌液经 10 000r/min 离心 10min，取上清液 150μl 于牛津杯中，静置过夜，转到 30℃培养箱恒温培养 24h，用无菌水作阴性对照，用农用链霉素作阳性对照（CK）。

三、龙眼内生芽胞杆菌及细菌分离纯化

通过菌落形态、颜色观察，从龙眼果实的果皮和果肉中分离纯化得到可培养的 25 株内生细菌和 10 株内生真菌，见图 5-17。对这些内生细菌进行数量统计，龙眼不同部位内生菌含量不同，其中果皮内生菌含量为 110CFU/g w，果肉内生菌含量为 94CFU/g w，果皮中的内生菌含量高于果肉。

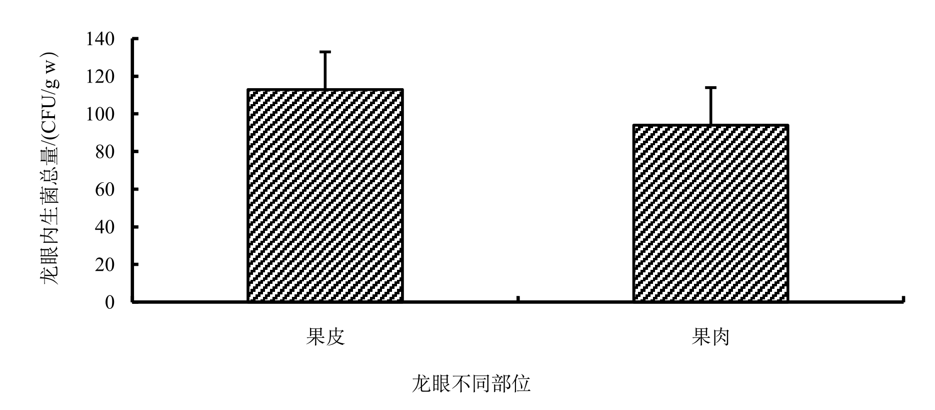


图 5-17　龙眼果皮和果肉分离的内生菌总数

四、龙眼果实腐烂致腐菌分离与纯化

1. ‘福眼’腐烂致腐菌的含量及分布

实验结果见表 5-56。‘福眼’果皮和果肉的腐烂致腐菌含量有所不同，‘福眼’果皮的腐烂致腐菌含量比果肉多，果皮腐烂致腐菌含量为 44.82×10^3CFU/g w，果肉腐烂致腐菌含量为 20.43×10^3CFU/g w，‘福眼’果皮、果肉共分离 54 株细菌，果皮和果肉腐烂致腐菌总体含量不同，果皮腐烂致腐菌含量多于果肉。

表 5-56　‘福眼’果实不同部位致腐菌含量

福眼不同部位	细菌含量/（$\times10^3$CFU/g w）
果皮	44.82
果肉	20.43

2. 龙眼采后病害致腐菌的脂肪酸鉴定

结果见表 5-57，菌株 6190 与 *Clavibacter micrhiganenisis* 菌的相似指数达 0.341，说明菌株 6190 为非典型的密执安棍状杆菌；菌株 6191 与 *Staphylococus simucan*s 的相似指数达 0.459，说明菌株 6191 为非典型的葡萄球菌属；菌株 6192 与 *Micrococcus lutens* 的相似指数达 0.716，说明菌株 6192 为典型的微球菌属菌；菌株 6193 与 *B. coagulans* 的相似指数达 0.405，说明菌株 6193 为芽胞杆菌；菌株 6194 与 *Staphylococus cohnii* 的相似指数达 0.519，说明菌株 6194 为典型的葡萄球菌属；菌株 6195 与 *Staphylococus simnlans* 的相似指数达 0.498，说明 6195 为非典型的葡萄球菌属；菌株 6196 与 *B. choshinensis* 的相似指数达 0.533，说明 6196 为典型的短芽胞杆菌；菌株 6197 与 *P. polymyxa* 的相似指数达 0.534，说明 6197 为典型的类芽胞杆菌。

表 5-57 与 MIDI 数据库比对结果

菌种名称	相似性指数*	菌种名称
6190	0.341	*Clavibacter micrhiganenisis*
6191	0.459	*Staphylococus simucan*
6192	0.716	*Micrococcus lutens*
6193	0.405	*B. coagulans*
6194	0.519	*S. cohnii*
6195	0.498	*S. simnlans*
6196	0.533	*B. choshinensis*
6197	0.534	*P. polymyxa*

* 细菌鉴定仪对于相似性指数的诠释：大于 0.500 说明匹配性很高，为典型的菌种；大于 0.300 小于 0.500 说明匹配性较低，为非典型菌种；小于 0.300 说明数据库没有此菌种的数据，给出的是最接近的相关菌

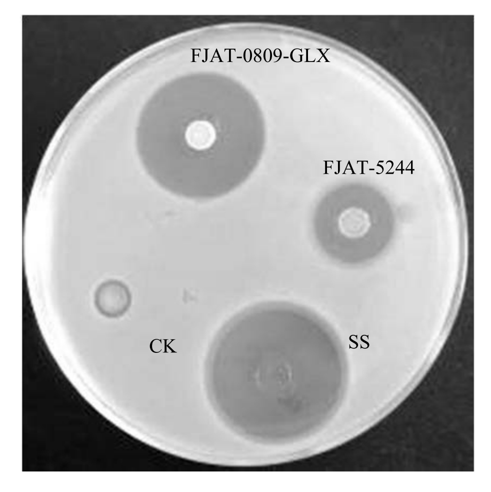
3. 龙眼采后致腐菌的 ITS 鉴定

利用引物 ITS4/ITS5 对菌株（3308、3309、3310、3311、3312）进行 rDNA-ITS 扩增。从扩增图谱上可见，获得特异条带在 600bp 左右。序列测定结果显示，序列中包含部份 18S rRNA、ITS4、5.8S rRNA、ITS5 及部分 28S rRNA。将所得序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索。根据 Landeweert 等（2003）对真菌的分子分类原则，即认为通过 ITS 区域比对，序列相似性≥99%，鉴别为相同种；序列相似性大于 95%且小于 99%，鉴别为相同属；序列相似性≤95%，鉴别为相同科。菌株 3308 为粉红单端孢菌（*Trichothecium roseum*），菌株 3309、3310、3311、3312 是葡萄座腔菌（*Botryosphaeria parva*）。

五、龙眼保鲜功能芽胞杆菌的筛选

通过初步筛选和复筛，从各种水果及本实验室菌种库中共筛选到一株对龙眼致腐菌

霉菌有很强抑制效果的拮抗菌 FJAT-0809-GLX，经 16S rRNA 鉴定 FJAT-0809-GLX 为短短芽胞杆菌。这株菌株对龙眼腐生菌显示了较强的抑制效果。抑菌圈直径和示意图见图 5-18。FJAT-0809-GLX 对致腐细菌的抑菌直径达 17mm；对致腐真菌的抑菌带为 18mm。



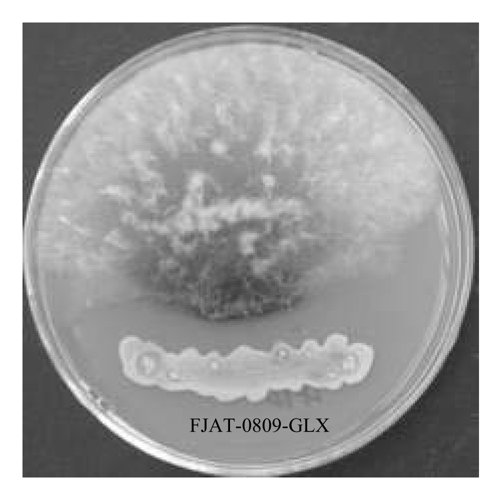


图 5-18　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 对龙眼果实致腐细菌和真菌的抑菌作用

六、讨论

龙眼属无患子科的龙眼属植物，原产于我国，是我国南方的特产名果，但对龙眼病害，以往研究较少，防治也较差，仅记载真菌病害 5 种，病毒性病害 1 种，寄生性种子植物 4 种，寄生藻 1 种，共 11 种。20 世纪 80 年代以来，我国南方特别是广东龙眼果实价格提高，种植面积扩大，研究工作随之加强，防治技术也有所提高。至 90 年代初期，已记载的龙眼病害有 51 种，包括真菌病害 27 种，病毒 1 种，线虫病 5 种，寄生种子植物 7 种，寄生苔藓、地衣和蕨类 8 种，寄生藻 1 种，非侵染性病害 2 种。龙眼病害以病毒性龙眼鬼帚病为最主要，发生普遍而严重。

龙眼致腐菌的鉴定通常包括宿主组织的显微检查，根据主要群体和个体的形态特点进行归类与鉴定，同时可辅以生理生化及生态等特征加以鉴别。丝状真菌的群体形态（即菌落形态）是识别它们的重要依据，如菌落大小、颜色、表面特征、质地和生长速度等，个体形态有菌丝、子实体、孢子和产孢结构等特征。实验结果表明，从不同腐烂等级的龙眼果实中分离到 54 株细菌，11 株真菌，所分离的龙眼腐烂致腐菌经 ITS 鉴定，菌株 3308 为粉红单端胞菌，菌株 3309、3310、3311、3312 为葡萄座腔菌；经脂肪酸鉴定的细菌菌株有 8 种：菌株 6190 为非典型的密执安棍状杆菌；菌株 6191 为非典型的葡萄球菌属；菌株 6192 为典型的微球菌属菌；菌株 6193 为芽胞杆菌；菌株 6194 为典型的葡萄球菌属；菌株 6195 为非典型的葡萄球菌属；菌株 6196 为典型的短短芽胞杆菌；菌株 6197 为典型的类芽胞杆菌。

目前，对果蔬病虫害的防治依然以化学药剂为主，而化学药剂防治不但造成环境污染而且使病原菌的抗药性增加，生物防治是目前重要的手段。本节筛选到一株芽胞杆菌

FJAT-0809-GLX，对龙眼霉菌具有很好的抑制效果。FJAT-0809-GLX 是一种短短芽胞杆菌（郑雪芳等，2006），是福建省农业科学院从西瓜根际土壤中筛选得到的芽胞杆菌，实验早已表明这种菌对黄瓜、西瓜、辣椒、豇豆等作物的枯萎病病原菌具有较强的抑制作用，对于短短芽胞杆菌在生物防治上的应用研究，国内外均有报道（侯仲轲和张立杰，2000；Edwards *et al.*，1992；张晓舟等；2005；Walker *et al.*，1998）；但是在该菌抑菌物质的性质上，人们的看法不同。李盛等（2002）从短短芽胞杆菌中分离纯化到一种新几丁质酶，该酶具有高度的热稳定性和蛋白酶抗性，可用于生物控制领域；Edwards（1993）认为短短芽胞杆菌对灰霉菌的抑制机理是分泌短杆菌肽 S。至于 FJAT-0809-GLX 对龙眼致腐菌的抑制机理还要作进一步的研究。

第六章　芽胞杆菌生物防治特性

第一节　植物病害芽胞杆菌生防菌的筛选

一、茄科青枯病芽胞杆菌生防菌筛选

1. 概述

由青枯雷尔氏菌（*Ralstonia salanacearum*）引起的植物青枯病是一类世界性的土传植物病害，其危害重、损失大、分布广，我国的四川、浙江、福建、江西、广东、广西等省区发病较严重。目前对该病原菌的防治主要采用化学药剂为主，但长期使用不仅造成生态环境严重污染，而且直接增加农产品有毒化学物质的残留量，对人类健康带来危害。生物防治对人畜安全，环境兼容性好，病菌不易产生抗药性，因而引起人们的重视，并初见成效。土壤中含有丰富的芽胞杆菌，芽胞杆菌产生的活性物质对病原菌生长也有一定的抑制作用，研究芽胞杆菌对植物病原菌的抑制作用，对于开发微生物制剂有着十分重要的意义。已报道的青枯病生防菌主要有芽胞杆菌和无致病力青枯雷尔氏菌等（刘邮洲等，2012；陈庆河等，2004；王小兵等，2011；Algam *et al.*，2006；Xue *et al.*，2009）。传统的芽胞杆菌生防菌筛选方法大多是以纯化好的菌株为靶标进行生防菌筛选，此方法工作量大，费时费力，效率低。为了提高生防菌筛选效率，作者建立了一种新的筛选方法，即先将病原菌青枯雷尔氏菌菌液与培养基混合后倒板，土壤稀释液 80℃水浴 10min 后按稀释梯度涂布在已混有病原菌的平板上，然后观察抑菌效果。目前未见文献报道采用此方法从土壤中筛选芽胞杆菌生防菌。

在番茄青枯病的生物防治中，拮抗细菌的利用一直是国内外学者的研究热点，而且也筛选到了不少在实验室内对青枯雷尔氏菌有明显抑制作用的菌株，迄今国内外文献中出现了许多关于拮抗细菌防治植物青枯病的相关报道（Hallmann *et al.*，2001；Gopalakrishnan and Peter，1991；JetiyAnon *et al.*，2002），涉及的生防细菌主要有假单胞菌（如荧光假单胞菌、洋葱假单胞菌等）、链霉菌、芽胞杆菌（如多粘类芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、短芽胞杆菌等）等（靳绍菊和钟士传，1997；El-Abyad *et al.*，1993；徐进等，2003；任争光等，2006）。芽胞杆菌由于能产生抗逆性极强的芽胞，具有营养简单、繁殖速度快等优点，从而更有利于商品化菌剂的生产、运输和保存，并且相对于其他细菌类和真菌类的菌剂，其与化学农药复配使用的相容性更好并且使用效果较为稳定，使其成为筛选青枯雷尔氏菌拮抗细菌的重点来源（Obag and Korste，2003； Elizabeth and Handelsuan，1999）。利用此法作者筛选到了一株对青枯雷尔氏菌具有强抑制作用的芽胞杆菌，通过形态特征、生理生化特征、脂肪酸成分分析、16S rRNA 和转录间隔区（ITS）测序等方法将此菌鉴定为解淀粉芽胞杆菌（*B. amyloliquefaciens*），研究旨在为青枯病的防治提供一定的科学依据。

2. 研究方法

1）土壤样品的采集。使用五点法于福建省漳州市长泰县莲雾基地采集 0～20cm 深度处的莲雾根际土壤 6 份，每份样品采集 200g，4℃冰箱保存备用（表 6-1）。芽胞杆菌供试菌株见表 6-1，供试病原靶标菌为青枯雷尔氏菌强致病力菌株 FJAT-91。

表 6-1　土壤样本采集信息

土样编号	采集地点	生境类型	采集时间
C1	长泰巴芗莲雾基地	莲雾表土	2011/07/07
C2	长泰雪美果蔬农场	10～15cm 深	2011/07/07
C3	长泰巴芗莲雾基地	10～15cm 深	2011/07/07
C4	长泰雪美果蔬农场	表土	2011/07/07
C5	长泰“台湾黑珍珠莲雾园”	表土	2001/07/08
C6	长泰“台湾黑珍珠莲雾园”	15～20cm 深	2001/07/08

2）试验所用培养基。TTC 固体培养基：葡萄糖 5g、蛋白胨 10g、酶水解酪素 1g，定容至 1000ml，pH7.0～7.2。牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉浸膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g、琼脂 15g，定容至 1000ml，pH7.2。SPA 液体培养基：蔗糖 20g、蛋白胨 5g、KH_2PO_4 0.5g、$MgSO_4$ 0.25g、琼脂 15g，定容至 1000ml，pH7.2～7.4。以上培养基均在 121℃高压灭菌 20min 后方可使用。TSBA 培养基：TSB 30g、琼脂 15g，定容至 1000ml，121℃高压灭菌 15min。

3）土壤中芽胞杆菌生防菌的筛选。称取 10g 土壤样品至装有 90ml 无菌水的三角瓶，振荡 20min，80℃水浴 10min，水浴期间摇匀 2～3 次，使之充分水浴，即配成 10^{-1} 浓度，作为土壤悬液原液。土壤悬液稀释为 4 个浓度梯度：10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}，采用稀释平板涂布法吸取 100μl 土壤悬液涂布到事先倒好含有青枯雷尔氏菌的混合平板，每次浓度梯度各重复 3 次。将涂好的平板正放静置 1h，放入 30℃恒温箱中培养 2d。培养好的平板对着光观察抑菌圈，找出抑菌圈并编号、拍照。芽胞杆菌生防菌的纯化：采取连续划线法，纯化有抑菌圈的菌株，30℃培养 2d，直到得到纯培养物。

4）芽胞杆菌生防菌的抑菌特性。先在培养皿底部倒入一薄层 NA 培养基（直径为 15cm 的培养皿 25ml 为宜）为下层，上层为青枯雷尔氏菌菌株 FJAT-91 培养液与 NA 培养基的混合液（30ml 为宜），在超净工作台里风干，然后用一根直径为 7mm 的钢制打孔器往双层平板培养基打孔，孔中加入 100μl 候选拮抗菌株的培养液，注意不要溢出，放置片刻，待大部分候选拮抗菌株的培养液被培养基吸收，盖上培养皿盖，倒置于温室培养。培养一定时间后，观察是否出现明显的抑菌圈，并测量抑菌圈直径。

5）芽胞杆菌生防菌的鉴定。肉眼观察菌株在平板的培养特征，如菌落形状、质地、大小、颜色等。生理生化特征主要是参照东秀珠和蔡妙英（2001）编著的《常见细菌系统鉴定手册》和沈萍等（1996）的《微生物学实验》。16S rRNA 和 ITS 序列 PCR 扩增体系为 25μl：10×Buffer 2.5μl，dNTP Mixture （10mmol/L）0.5μl，引物 F 1.0μl，引物 R

1.0μl，*Taq* DNA 酶（2.5U/μl）0.3μl，DNA 1.0μl，无菌水 18.7μl。采用细菌通用 16S rRNA 引物 9F 5′-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′（9-27）和 1542R 5′-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3′（1542-1525），引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。4 株生防芽胞杆菌的基因组 DNA 提取方法采用水煮法。PCR 反应条件为 94℃预变性 180s，94℃变性 30s，55℃ 退火 45s，72℃复性 90s，72℃延伸 600s，35 个循环。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。ITS 基因序列扩增引物 L516SF 和 L523SR 由上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 反应条件：95℃预变性 45s，94℃变性 15s，58℃复性 30s，72℃延伸 90s，30 个循环，72℃延伸 10min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

6）芽胞杆菌生防菌的脂肪酸鉴定。见第五章第三节。

7）数据分析：芽胞杆菌生防菌的 16S rRNA 和 ITS 序列由上海生物工程有限公司进行测序。所得序列经 NCBI 进行 Blast 比对后，再经 ClustalX 对齐后，用软件 Mega 5.0 进行聚类分析（方法为 Neighbour-Joining，Nucleotide：Jukes-Cantor），构建聚类树。

3. 青枯病芽胞杆菌生防菌的筛选

芽胞杆菌供试菌株见表 6-2。利用供试的 10 株芽胞杆菌，进行青枯雷尔氏菌抑菌圈实验（图 6-1），结果表明，芽胞杆菌对青枯雷尔氏菌抑菌作用分为 3 类。

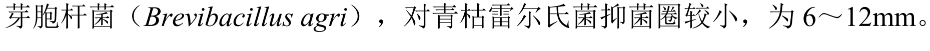
表 6-2　抗青枯雷尔氏菌的菌株信息

序号	编号	菌种原编号	种名	中文名
1	FJAT-8755	CCUG 28524T	*Bacillus atrophaeus*	深褐芽胞杆菌
2	FJAT-10010	DSM 13796T	*Bacillus endophyticus*	内生芽胞杆菌
3	FJAT- 8775	CCUG 26678T	*Bacillus mycoides*	蕈状芽胞杆菌
4	FJAT- 8778	CCUG 28882T	*Bacillus psychrosaccharolyticus*	冷解糖芽胞杆菌
5	FJAT-8782	CCUG 27413T	*Bacillus smithii*	史氏芽胞杆菌
6	FJAT-8783	CCUG 7428T	*Lysinibacillus sphaericus*	球形赖氨酸芽胞杆菌
7	FJAT-8790	CCUG 31345T	*Brevibacillus agri*	土壤短芽胞杆菌
8	FJAT-10002	DSM 29T	*Paebacillus alvei*	蜂房类芽胞杆菌
9	FJAT-10003	DSM 11730T	*Paebacillus amylolyticus*	解淀粉芽胞杆菌
10	FJAT-10020	DSM 5162T	*Paebacillus glucanolyticus*	解葡聚糖类芽胞杆菌

第 1 类：1 个种，即 FJAT-10003 解淀粉芽胞杆菌（*P. amylolyticus*）对青枯雷尔氏菌抑菌圈最大，达 20.6mm。

第 2 类：5 个种，即FJAT-8755 深褐芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）、FJAT-8775 蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）、FJAT-8778 冷解糖芽胞杆菌（*B. psychrosaccharolyticus*）、FJAT-8783 球形赖氨酸芽胞杆菌（*L. sphaericus*）、FJAT-10002 蜂房类芽胞杆菌（*P. alvei*），对青枯雷尔氏菌抑菌圈中等，为 14～16mm。

第 3 类：4 个种，FJAT-8774 巨大芽胞杆菌（*B. megatherium*）、FJAT-8782 史氏芽胞杆菌（*B. smithii*），FJAT-10010 内生芽胞杆菌（*B. endophyticus*）、FJAT-8790 土壤短


芽胞杆菌（*Brevibacillus agri*），对青枯雷尔氏菌抑菌圈较小，为 6～12mm。

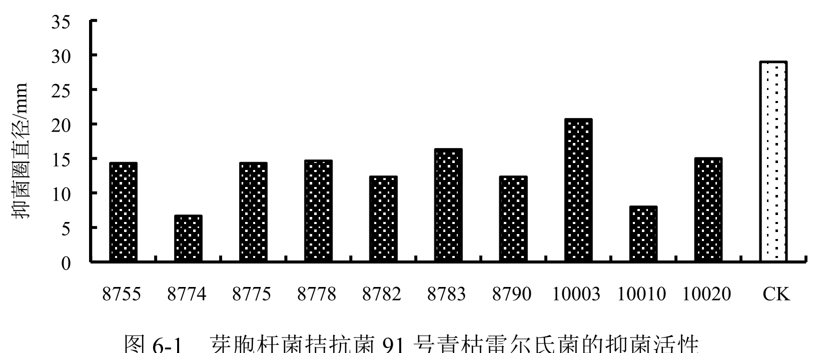


图 6-1　芽胞杆菌拮抗菌 91 号青枯雷尔氏菌的抑菌活性

4. 土壤中芽胞杆菌生防菌分离

土壤样本溶液于 80℃水浴 15min 后，从 6 份土样分离筛出 36 个出现抑菌圈的菌落，其中抑菌圈最大的菌株为 FJAT-B，具体见图 6-2。连续培养 5 代后，未发现菌株发生变异、退化及抑菌活性降低的现象。

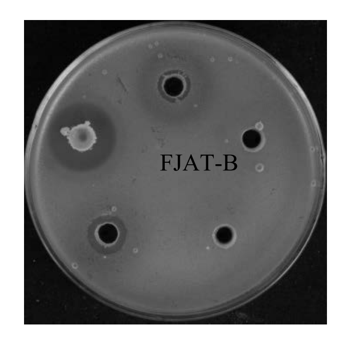
图 6-2　初筛过程出现的抑菌圈

5. 芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 抑菌特性

对筛选出的芽胞杆菌 FJAT-B 采用打孔法进行抑菌试验，具体见图 6-3。左图是取 1ml 青枯雷尔氏菌菌液与 20ml 培养基混合，右图是 300μl 病原菌菌液与 20ml 培养基混合，同时取 100μL 芽胞杆菌生防菌 B 菌液加入孔中。从左右两图中可以看出菌株 FJAT-B 对青枯雷尔氏菌具有强抑制作用。

6. 芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 形态特征

TSBA 培养基培养 48h 后的菌落形态见图 6-4。菌落干燥，有褶皱，无光泽，粗糙，中间凸起。



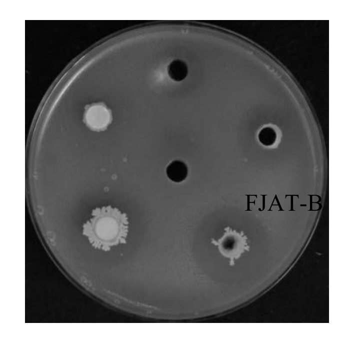


图 6-3　芽胞杆菌生防菌的抑菌作用

左图为青枯雷尔氏菌液 1ml，右图为病原菌菌液 300μl

图 6-4　芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的菌落形态

7. 芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 生理生化特征

菌株 FJAT-B 接种于 NB 培养基，30℃培养，随着时间的增加，菌体吸光度值逐渐上升，接种后的 20h 内菌株生长缓慢，20～24h 菌株 FJAT-B 呈快速生长状态，24～48h 基本处于稳定期，48h 后进入衰亡期。FJAT-B 的生长趋势见图 6-5。FJAT-B 的生长最适 pH 为 7～8，在 pH4 和 pH9 时基本不能生长（图 6-6）。

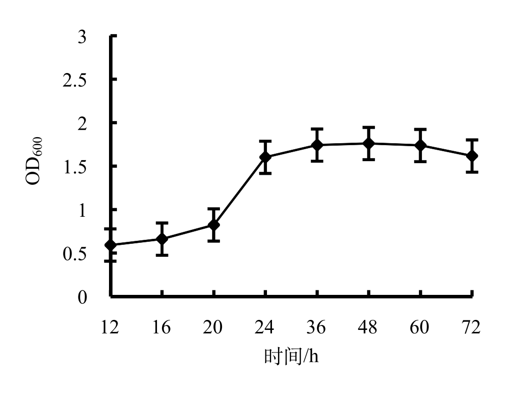


图 6-5　芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的生长曲线

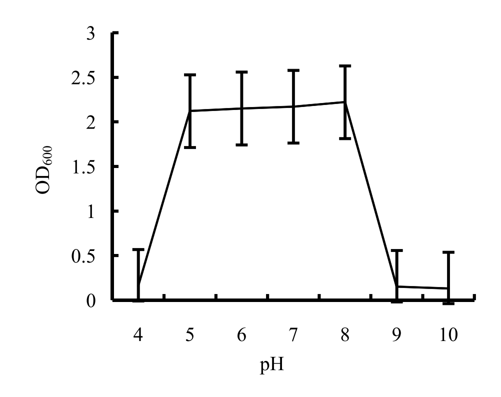


图 6-6　芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的生长最适 pH

由图 6-7 可知，菌株 FJAT-B 的生长随着培养基中 NaCl 浓度的增加而减缓，10%时生长微弱，15%时基本不能生长。

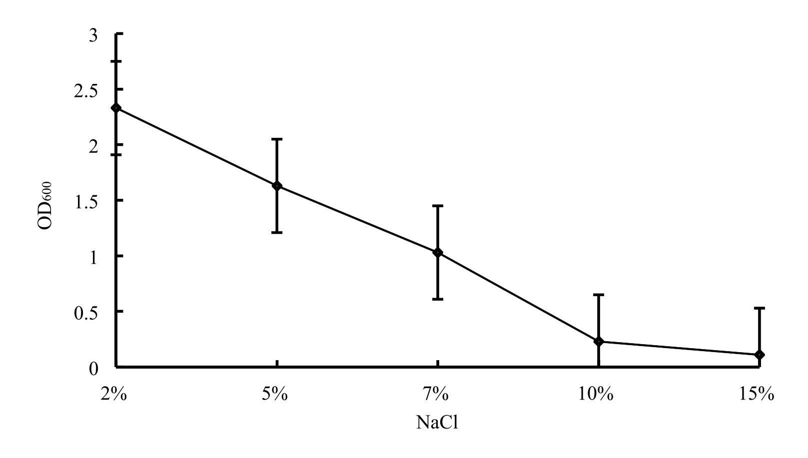


图 6-7　芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的耐盐能力

芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的生化特征见表 6-3。在 Koser 肉汤中能生长，能利用纤维二糖、甘露醇、葡萄糖、蔗糖等碳源，能水解明胶、七叶苷和苦杏仁苷，在无盐胰胨水和氰化钾溶液中能生长，赖氨酸脱羧酶肉汤、精氨酸水解培养基、精氨酸双水解酶肉汤、鸟氨酸脱羧酶肉汤反应为阳性。不产生 DNA 酶，MR 反应阴性，不能利用甘油、阿拉伯醇、蜜二糖、丙酮酸、侧金盏花醇、赤藓醇、麦芽糖、木糖醇、山梨醇、蕈糖、肌醇、鼠李糖、松二糖、卫矛醇，西蒙氏枸橼酸盐、葡萄糖胺、酒石酸盐、丙二酸盐、乙酸盐、黏液酸反应为阴性。

表 6-3　芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的生化特征

项目	反应	项目	反应
DNA	–	酒石酸盐	–
Koser 氏肉汤	+	肌醇	–
MR	–	葡萄糖	+
阿拉伯醇	–	葡萄糖胺	–
半固体琼脂	+	鼠李糖	–
半乳糖	–	水杨苷	–
丙二酸盐	–	松二糖	–
丙酮酸	–	卫矛醇	–
侧金盏花醇	–	无盐胰胨水	+
赤鲜醇	–	七叶苷	+
乙酸盐	–	氰化钾实验	+
甘露醇	+	西蒙氏枸橼酸盐	–

续表

项目	反应	项目	反应
甘油	–	黏液酸	–
蔗糖	+	苦杏仁苷	+
麦芽糖	–	硫化氢	–
蜜二糖	–	明胶	+
棉子糖	–	硝酸盐还原（产气）	–
纤维二糖	+	赖氨酸脱羧酶肉汤	+
木糖醇	–	精氨酸水解培养基	+
蕈糖	–	精氨酸双水解酶肉汤	+
山梨醇	–	鸟氨酸脱羧酶肉汤	+

8. 芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 分子鉴定

芽胞杆菌生防菌菌株 FJAT-B 的 16S rRNA 序列测得 706bp（GenBank 登录号为 JQ948093），全部碱基如下。

caagtcgagcggacagatgggagcttgctccctgatgttagcggcggacgggtgagtaacacgtgggtaacctgcctgtaagactgg
gataactccgggaaaccggggctaataccggatggttgtttgaaccgcatggttcagacataaaaggtggcttcggctaccacttacaga
tggacccgcggcgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggcgacgatgcgtagccgacctgagagggtgatcggccaca
ctgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaatcttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgcc
gcgtgagtgatgaaggttttcggatcgtaaagctctgttgttagggaagaacaagtgccgttcaaatagggcggcaccttgacggtacct
aaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtaggtggcaagcgttgtccggaattattgggcgtaaaggg
ctcgcaggcggtttcttaagtctgatgtgaaagcccccggctcaaccggggagggtcattggaaactggggaacttgagtgcagaaga
ggagagtggaattccacgtgtagcggtgaaatgcgtagagatgtggaggaacaccagtggcgaaggcgactctctggtctgtaactga
cgc

菌株经 NCBI Blast 在线比对得出，芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 和解淀粉芽胞杆菌最接近。从菌株 FJAT-B 和参考菌株的系统发育上分析也可以看出，菌株 FJAT-B 和解淀粉芽胞杆菌构成一个分支，从而可以判断菌株 FJAT-B 为解淀粉芽胞杆菌（图 6-8）。

ITS 序列 418bp（GenBank 登录号为 JQ948094），全部碱基如下。

ttcccgggcccaaggcatccgcccgtgcgcccywtcgtaasttaaccgytaaaaagaatcactacgtgatatcttgcattactaaytgaa
tgtgaattacttctgttatctagttttcaaagaacaatatctcgaagaatcgaatgatccttcaaaactaaacaagacagggaacgttctgttta
taagacccaaggtcttatattccgttaaaatccttagaaaggaggtgatccagccgcaccttccgatacggctaccttgttacgacttcacc
ccaatcatctgtcccaccttcggcggctggctcctaaaaggttacctcaccgacttcgggtgttacaaactctcgtggtgtgacgggcggt
gtgtacaaggcccgggaacgtattcaccgcggcatgctgatccgcgatta

由芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 的 ITS 序列在 NCBI 中的比对可以得出菌株 FJAT-B 为解淀粉芽胞杆菌。菌株 FJAT-B 与参考菌株系统发育树中的解淀粉芽胞杆菌构成一个分支，bootstrap 支持率为 100%。结合以上分析，芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 为解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloiquefaciedns*（图 6-9）。

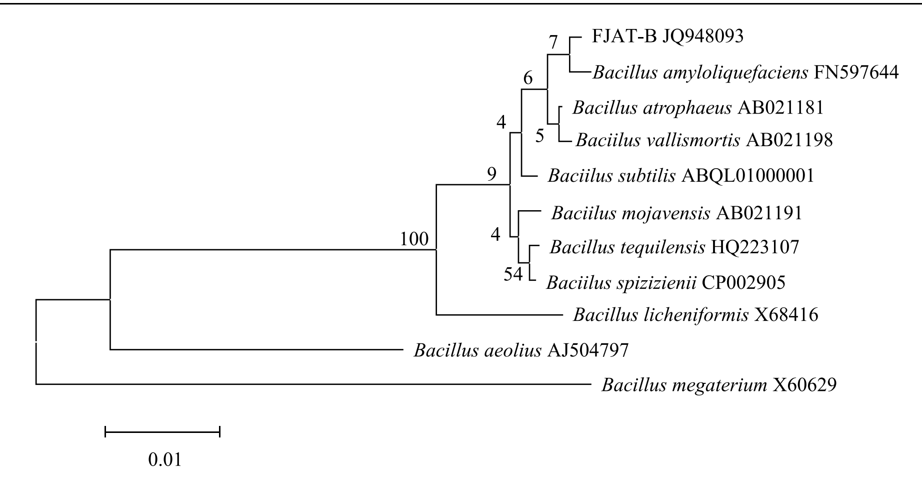


图 6-8　芽胞杆菌生防菌 FJAT- B 的 16S rRNA 系统发育树

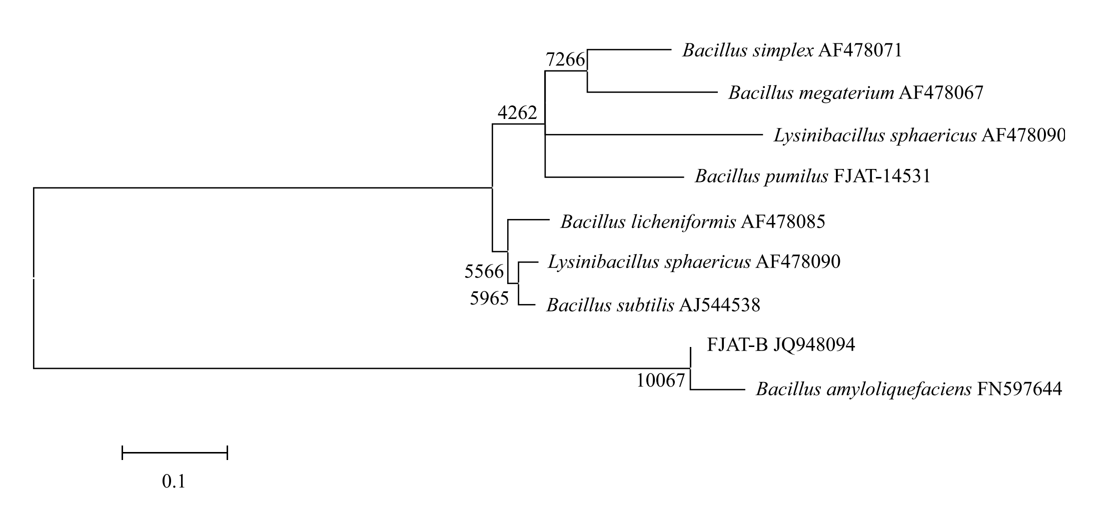


图 6-9　芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 和参考菌株 ITS 系统发育树

9. 芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 脂肪酸分析

芽胞杆菌生防菌解淀粉芽胞杆菌 FJAT-B（*B. amyloiquefaciedns*）的脂肪酸检测结果具体见表 6-4。系统根据各特征性色谱峰的保留时间计算 ECL 值以确定目标组分的存在，并采用峰面积归一化法计算各组分的含量（表 6-4）。菌株 FJAT-B 的主要脂肪酸类型为 15：0 iso（23.56%）和 15：0 anteiso（38.13%），其次为 16：0 iso（7.10%）、16：0（7.62%）、17：0 iso（8.91%）和 17：0 anteiso（9.43%）。

10. 讨论

芽胞杆菌内生芽胞，繁殖能力强，有利于工业化生产，又是自然界中广泛存在的非致病细菌，对人畜无害，不污染环境。芽胞杆菌属的菌群是土壤中微生物的优势菌群，可以产生很多抗菌物质，抑制多种病原菌的生长（何红等，2002；刘静等，2004；徐刘平

表 6-4　解淀粉芽胞杆菌 FJAT-B（*B. amyloiquefaciedns*）脂肪酸检测结果

保留时间	峰值	面积峰高比（Ar/Ht）	因子相关系数	相对长链度（ECL）	脂肪酸名称	峰值百分比/%
2.0728	3368	0.009	0.981	13.6281	14：0 iso	2.53
2.1817	1076	0.009	0.973	13.9993	14：0	0.80
2.3773	32 008	0.011	0.961	14.6324	15：0 iso	23.56
2.4059	51 891	0.010	0.960	14.7251	15：0 anteiso	38.13
2.6929	9780	0.009	0.948	15.6344	16：0 iso	7.10
2.7400	823	0.012	0.947	15.7822	16：1 ω11c	0.60
2.8092	10 532	0.009	0.945	15.9997	16：0	7.62
2.9417	387	0.009	0.943	16.4163	17：1 isoω10c	0.28
3.0115	12 352	0.009	0.942	16.6358	17：0 iso	8.91
3.0424	13 082	0.009	0.942	16.7328	17：0 anteiso	9.43
3.4437	1444	0.010	0.942	18.0004	18：0	1.04

和尹燕妮，2006；石志琦等，2005；谢晶等，2004）。因此，利用芽胞杆菌进行植物病害生物防治成为一个研究热点。作为生防菌，必须在环境中有较强的竞争力，利用该法筛选到的芽胞杆菌生防菌具有较高的生存竞争力和拮抗力。筛选可快速生长的生防菌是提高防效的途径之一，但对具有该种作用机理的拮抗菌的室内筛选研究报道并不多。郭荣君等（2010）利用营养竞争平板筛选法获得了可在大豆麦麸（SWB）培养基上快速生长并拮抗大豆根腐病原菌的枯草芽胞杆菌，但此法效率并不高。利用土壤溶液涂布在混有病原菌菌液的平板上，从 6 份土壤中快速筛选到了一株生长速率快且对青枯雷尔氏菌具有强拮抗作用的芽胞杆菌生防菌。

近年来，研究表明解淀粉芽胞杆菌能够有效抑制尖孢镰刀菌（权春善等，2006；雷白时等，2012）、植物病原真菌灰霉等引起的真菌性病害，而对其抑制细菌性病害的报道较少。本文筛选到的一株对青枯雷尔氏菌强致病性的菌株具有较强抑制作用的生防菌 FJAT-B，经多相分类法鉴定为解淀粉芽胞杆菌。同时由于解淀粉芽胞杆菌易产生芽胞，利于储存和运输，有望成为防治植物青枯病的生物农药。

枯草芽胞杆菌类群的菌具有很高的同源性，很难区分开。根据文献报道，目前已从枯草芽胞杆菌中分化出 *B. atrophaeus*（Nakamura，1989）和 *B. mojavensis*（Roberts *et al.*，1994）两个菌种，与其很相近的有 *B. tequilensis*（Gatson *et al.*，2006）和 *B. vallismortis*（Roberts *et al.*，1996）。并且将枯草芽胞杆菌分为 *B. subtilis* subsp. *subtilis*（Nakamura *et al.*，1999）、*B. subtilis* subsp. *inaquosorum*（Rooney *et al.*，2009）和 *B. subtilis* subsp. *spizizenii*（Nakamura *et al.*，1999）3 个亚种。大量的实验只是将枯草芽胞杆菌及其相近菌种确定为枯草芽胞杆菌，而没有更深入地研究它们的同源性。

随着测序技术的普及、测序周期的缩短、成本的降低、微生物核酸序列数据库的不断充实，16S rRNA 序列和 16～23S rRNA 间的内源转录间隔区（internally transcribed spacer，ITS）序列测定已成为细菌的一种快速鉴定方法。ITS 是居于 16S rRNA 和 23S rRNA

之间的一段高度可变的序列，它弥补了 16S rRNA 保守性强、分化程度不够的缺点，成为对细菌在种和亚种水平上进行分类鉴定的有力工具。Xu 和 Côté（2003）利用 ITS 序列解释了芽胞杆菌科 6 个属 40 个种的系统发育关系，证明 ITS 可以更好地用于芽胞杆菌菌种的鉴定。刘国红等（2012）利用 ITS 和脂肪酸鉴定手段将 16 株芽胞杆菌准确地鉴定到种，也证明了 ITS 和脂肪酸鉴定的可靠性。研究通过 16S rRNA 序列和 ITS 序列两种鉴定手段并结合表型特征将芽胞杆菌生防菌 FJAT-B 准确鉴定为解淀粉芽胞杆菌。从土壤中筛选对青枯雷尔氏菌具有拮抗作用的解淀粉芽胞杆菌，且该菌株具有良好的遗传稳定性和生防潜力，可进一步对菌株的发酵条件进行优化和分离鉴定抑菌活性产物，希望为青枯病的防治奠定一定的研究基础。

二、瓜类枯萎病芽胞杆菌生防菌筛选

1. 概述

真菌性枯萎病、黄萎病和细菌性青枯病，是西瓜、棉花和番茄等重要经济作物上危害最为严重的 3 种土传性植物病害，给这些作物生产造成重大损失（王芳等，2006；张志忠等，2005；黎起秦和陈永宁，2000）。目前，化学农药在防治植物病害中仍起着重要的作用，但病原菌的多样性和变异性给植物病害的化学防治带来困难，而且长期使用化学农药会带来农药残留、环境污染及破坏生态平衡等问题。近年来，国内外学者对寻求拮抗菌株防治植物病害给予普遍关注，并且在土壤生态系统中，筛选到一些具有较好生防前景的有益微生物（Ozaktan and Bora，2000；马艳等，2006；Dula *et al.*，1987；郝晓娟等，2005）。本研究从西瓜、豇豆等作物根际土壤分离芽胞杆菌，试验其对不同作物枯萎病尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum* Schl.）的拮抗作用；芽胞杆菌对枯萎病病原菌镰刀菌也有很好的抑制作用（朱育菁等，2007）。本实验通过平板对峙法对 50 株芽胞杆菌进行初步筛选，并对筛选出的具有显著拮抗作用的菌株 JK-2 进行了形态、培养特征、生理生化等性状的鉴定、16S rDNA 序列测定及 Sherlock MIS 脂肪酸分析，现将结果报道如下。

2. 研究方法

1）供试病原菌。西瓜、黄瓜、甜瓜、豇豆、花生和辣椒枯萎病尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）、番茄青枯雷尔氏菌（*Ralstonia solanacearum*）由本研究中心保存；棉花黄萎病大丽轮枝菌（*Verticillium dahliae*）11 938 菌株、棉花黄萎病黑白轮枝菌（*Verticillium alboatrum*）12 230 菌株和蘑菇褐斑病真菌轮枝霉（*Verticillium fungicola* ）2352 菌株引自德国微生物保存中心（DMSZ）；番茄灰霉病菌（*Botrytis cinerea*）和禽致病性大肠杆菌（*Escherichia coli*）K88 菌株分别由福建农林大学植物保护学院和福建省农业科学院畜牧兽医研究所馈赠。

2）培养基。病原真菌采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）培养；青枯雷尔氏菌采用蔗糖蛋白胨琼脂培养基（SPA）培养；芽胞杆菌和大肠杆菌的平板培养采用牛肉膏蛋白胨（NA）培养基；芽胞杆菌的摇瓶培养采用 BPY 培养基（蛋白胨 1.0%、牛肉浸膏 0.5%、

酵母浸出物 0.3%、葡萄糖 0.5%、NaCl 0.5%，pH7.0～7.2）。

3）土样采集与芽胞杆菌的分离纯化。从福建省永泰、福清、闽侯等 6 个县（市）的西瓜、芋葫、豇豆等作物根际采集土壤样本 120 份，风干、研磨后，制成土壤悬液，再经无菌水适当稀释，涂布于 NA 平板；于 30℃条件下培养 72h 后，挑取单菌落，涂片镜检；选取芽胞杆菌转入斜面培养基保存，作为待测菌株。

4）尖孢镰刀菌拮抗菌株的筛选。拮抗菌株的筛选采用牛津杯法。待测芽胞杆菌在 30℃、200r/min 下培养 72h ，收集培养液；PDA 平板培养尖孢镰刀菌，7d 后用无菌水收集孢子，制成孢子悬液；将制备好的孢子悬液加入到温度降至约 50℃的融化的 PDA 培养基内，迅速混匀，再倒入培养皿内；凝固后，在培养基平板上放置牛津杯，向杯内加入待测菌株培养液 200μl，以无菌水为对照；26℃培养 48h，用直径交叉法测量抑菌圈直径，筛选有拮抗作用的菌株。

5）拮抗菌株对不同病原菌的拮抗性能测定。研究筛选出的拮抗菌株（JK-2）对大丽轮枝菌、黑白轮枝菌、真菌轮枝霉、番茄灰霉病菌和青枯雷尔氏菌、禽致病性大肠杆菌的抑制作用。

6）培养特征和形态特征。接种菌株 JK-2 于 NA 培养基平板，30℃培养 72h，观察菌落颜色和形态，显微镜观察菌体的形态特征。

7）生理生化特征试验。参照东秀珠和蔡妙英（2001）的方法进行。

8）分子生物学（16S rDNA）鉴定。摇瓶培养菌株 JK-2，收集菌体，用酚-氯仿法抽提基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板，采用引物 Pf（+）5′-GGTTAAGTCCC-GCAACGAGCGC-3′和 Pr（–） 5′-AGGAGGTGATCCA AC CGCA-3′（上海生工生物工程技术服务有限公司合成）进行 16S rDNA-PCR 扩增。25μl 反应液中包含 1×PCR Buffer，50ng DNA，1mmol/L dNTP，0.4mmol/L 引物，1.5U *Taq* 酶。PCR 扩增条件为：94℃预变性 5min，94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃复性 30s，25 个循环；72℃延伸 7min。反应结束后，用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果，用 Promega 公司的 Wizard PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，回收目的片段。目的片段的 DNA 序列在宝生物工程（大连）有限公司进行测定。将测序结果通过因特网检索 GenBank，采用 Blast 软件进行序列同源性比较，确定菌株的分类地位。

9）Sherlock MIS 鉴定。参照第五章第三节。

10）拮抗菌株防治西瓜枯萎病的田间小区试验。试验在福建永泰进行，选择往年枯萎病发生较为严重的田块；供试西瓜品种为‘早春红玉’，灌根法处理移栽后 1d 的西瓜苗。JK-2 培养液（40 亿活芽胞/ml）的亩施用量为 2L，稀释 100 倍；清水对照。每处理 3 个重复，每重复（小区）面积 67m^2（约 100 株），随机排列。于处理后 30d 进行调查，各小区随机抽取西瓜苗约 30 株，统计发病株数，计算发病率和防治效果。发病率和防治效果的计算方法为：发病率（%）= 病株数/调查株数×100，防治效果（%）=（对照发病率–处理发病率）/对照发病率×100。

3. 枯萎病芽胞杆菌生防菌的筛选

筛选出 16 株对香蕉枯萎病病原菌尖孢镰刀菌 370 有拮抗作用，占筛选总量的 32%，

菌株信息见表 6-5，其中有 10 株芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌尖孢镰刀菌 370 的抑制率高于 60%，芽胞杆菌 FJAT-8769 左乳酸芽胞杆菌 *B. laevolacticus* 对香蕉枯萎病病原菌的抑制率最高，为 73.3%，其次是 FJAT-8763 凝结芽胞杆菌 *B. coagnlans*、FJAT-8774 巨大芽胞杆菌 *B. megatherium*，抑菌率为 66.7%。

表 6-5　抗枯萎病病原菌的芽胞杆菌菌株信息

序号	菌种编号	种名	中文名	处理菌落半径/cm	对照菌落半径/cm	抑菌率/%
1	FJAT-8754	*B. amyloliquefaciens*	解淀粉芽胞杆菌	1.6	4.5	64.4
2	FJAT- 8755	*B. atrophaeus*	深褐芽胞杆菌	1.7	4.5	62.2
3	FJAT- 8756	*B. azotoformans*	产氮芽胞杆菌	2.4	4.5	46.7
4	FJAT- 8758	*B. benzoevorans*	食苯芽胞杆菌	1.8	4.5	60.0
5	FJAT- 8763	*B. coagulan*	凝结芽胞杆菌	1.5	4.5	66.7
6	FJAT- 8768	*B. kaustophilus*	嗜热芽胞杆菌	1.6	4.5	64.4
7	FJAT- 8769	*B. laevolacticus*	左乳酸芽胞杆菌	1.2	4.5	73.3
8	FJAT- 8774	*B. megatherium*	巨大芽胞杆菌	1.5	4.5	66.7
9	FJAT- 8777	*B. psychrophilus*	嗜冷芽胞杆菌	2.5	4.5	44.4
10	FJAT- 8778	*B. psychrosaccharolyticus*	冷解糖芽胞杆菌	1.6	4.5	64.4
11	FJAT- 8784	*B. subtilis*	枯草芽胞杆菌	2.5	4.5	44.4
12	FJAT- 8785	*G. thermoglucosidasius*	热稳葡萄糖苷酶地芽胞杆菌	2.0	4.5	55.6
13	FJAT- 8788	*B. velezensis*	贝莱斯芽胞杆菌	2.1	4.5	53.3
14	FJAT- 10002	*P. alvei*	蜂房类芽胞杆菌	2.0	4.5	55.6
15	FJAT- 10005	*B. mojavensis*	莫哈维芽胞杆菌	1.6	4.5	64.4
16	FJAT- 10007	*P. chondroitinus*	软骨酸类芽胞杆菌	1.8	4.5	60.0

目前国内已用于芽胞杆菌生防菌的种类有枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）、多粘类芽胞杆菌（*P. polymyxa*）、蜡状芽胞杆菌（*B. cereus*）、地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、巨大芽胞杆菌（*B. megaterizm*）和短小芽胞杆菌（*B. pumilis*）等（林福呈等，1990）。目前国内外应用芽胞杆菌防治植物病害非常广泛，有番茄青枯病、苹果红腐病、小麦赤霉病及其他一些土传和地上病害（陈志谊，1997）。林福呈等（1990）自西瓜根际分离的 3 个枯草芽胞杆菌对西瓜枯萎病菌大小分生孢子萌发及芽管的生长均有明显的抑制作用（王政逸，1990）。

4. 尖孢镰刀菌芽胞杆菌生防菌筛选

从 NA 平板上选择性地挑出外观有明显差别的细菌菌落，涂片镜检，获得 58 个芽胞杆菌；通过牛津杯法，筛选出对供试的 6 株尖孢镰刀菌都具有或部分具有抑制作用的芽胞杆菌 3 株；其中的一株，定名为 *B. brevis* JK-2，对供试镰刀菌的抑制作用特别强，抑

菌圈直径都在 15.0mm 以上（表 6-6 和图 6-10），而且抑制效果稳定。

表 6-6　短短芽胞杆菌 JK-2 对不同作物枯萎病的尖孢镰刀菌抑制作用

枯萎病病原菌菌株	寄主作物	抑菌圈直径/mm
F-X.1.7-030520-11	西瓜	19.8
F-H.6.5-030318-B2	黄瓜	16.6
F-T.1.7-030514-03	甜瓜	19.4
F-J.1.5-031017-01	豇豆	18.5
F-P.5.0-030710-01	花生	17.7
F-L.1.5-031017-01	辣椒	15.3

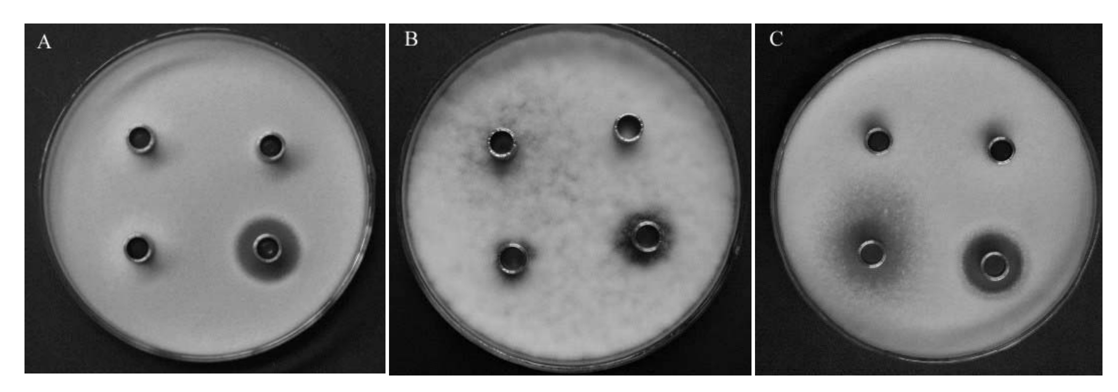


图 6-10　短短芽胞杆菌 JK-2 对不同作物枯萎病菌的抑制作用

图中各平板右下角为 JK-2；A. 甜瓜枯萎病病原菌；B. 辣椒枯萎病病原菌；C. 豇豆枯萎病病原菌

5. 芽胞杆菌生防菌 JK-2 对植物病原菌的抑制作用

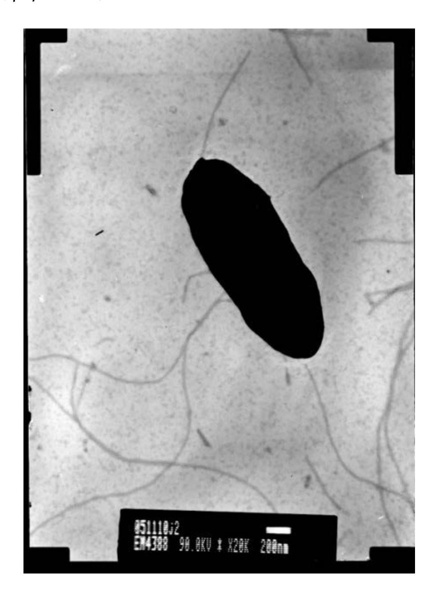
实验结果见表 6-7。菌株 JK-2 对不同的病原真菌、细菌均表现出较强的抑制作用：对黑白轮枝菌、大丽轮枝菌、真菌轮枝霉和番茄灰霉病菌等 4 种植物病原真菌的抑菌圈直径分别为 21.9mm、18.7mm、18.2mm 和 15.0mm，对黑白轮枝菌的抑制作用最强；对番茄青枯雷尔氏菌和大肠杆菌的抑制作用也较强，抑菌圈直径分别为 14.7mm 和 16.3mm。

表 6-7　短短芽胞杆菌 JK-2 对不同作物病原菌的抑制作用

病原菌菌株	抑菌圈直径/mm
番茄灰霉病菌（*Botrytis cinerea*）	15.0
真菌轮枝霉 2352（*Verticillium fungicola*）	18.2
大丽轮枝菌 11938（*Verticillium dahliae*）	18.7
黑白轮枝菌 12230（*Verticillium albo-atrum*）	21.9
青枯雷尔氏菌 F.1.3-010702-01-V（*Ralstonia solanacearum*）	14.7
大肠杆菌 K88（*Escherichia coli*）	16.3

6. 芽胞杆菌生防菌 JK-2 培养、形态和生理生化特征

菌株 JK-2 在 NA 培养基上，菌落无光泽，不透明，浅黄色，表面湿润。革兰氏染色阳性，营养体细胞杆状，大小约 0.7μm×2.6μm，周生鞭毛；芽胞近椭圆形，中生，不膨大（图 6-11）。



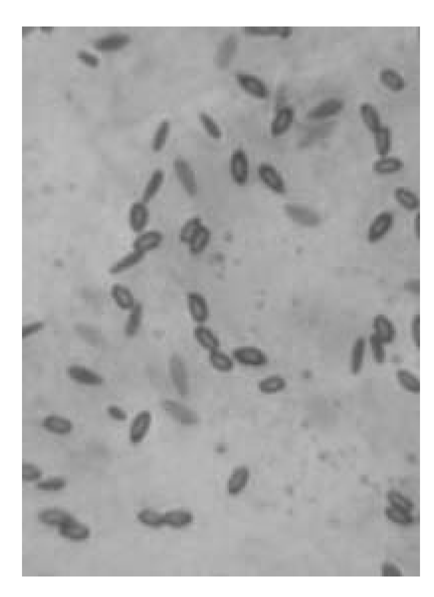


图 6-11　*Brevibacillus brevis* JK-2 的菌体形态

A. 电镜照片；B. 光学显微镜照片

对*B. brevis* JK-2的生理生化特征的鉴定结果为：VP试验、甲基红反应呈阴性，接触酶反应和氧化酶反应呈阳性；对碳源的利用表现为能利用葡萄糖、甘露醇，但不能利用木糖和L-阿拉伯糖，也不能水解淀粉；可以利用柠檬酸盐和硝酸盐，并且可以使明胶液化，但不能分解酪素；在含有7% NaCl的培养基上不能生长，在50℃以上温度不能生长（表6-8）。

表 6-8　短短芽胞杆菌 JK-2 的生理生化特征

试验项目	结果	试验项目	结果	试验项目	结果
接触酶	+	利用葡萄糖产酸	+	利用柠檬酸盐	+
氧化酶	+	利用甘露醇产酸	+	明胶液化	+
厌氧生长	–	利用木糖产酸	–	分解酪素	–
VP 试验	–	利用 L-阿拉伯糖产酸	–	7% NaCl 生长	–
VP<pH6	–	淀粉水解	–	pH5.7 生长	+
VP>pH7	–	利用葡萄糖产气	–	50℃生长	–
甲基红试验	–	硝酸盐还原	+		

7. 芽胞杆菌生防菌 JK-2 16S rDNA 序列分析

以菌株 JK-2 的基因组 DNA 为模板，利用引物 Pf、Pr 进行 PCR 扩增，得到一条约为 450bp 的 DNA 片段；回收该片段，并进行序列测定，菌株 JK-2 的 16S rDNA 长度为 427bp（图 6-12）。将菌株 JK-2 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行 Blast 比较，结果表明菌株 JK-2 与短芽胞杆菌（*B. brevis*）同源性达 99.4%。

```
TTATC TTTAG TTGCC AGCAT TCAGT TGGGC ACTCT AGAGA GACTG CCGTC GACAA GACGG AGGAA GGCGG
GGATG ACGTC AAATC ATCAT GCCCC TTATG ACCTG GGCTA CACAC GTGCT ACAAT GGTTG GTACA ACGGG
ATGCT ACCTC GCGAG AGGAC GCCAA TCTCT TAAAA CCAAT CTCAG TTCGG ATTGT AGGCT GCAAC TCGCC
TACAT GAAGT CGGAA TCGCT AGTAA TCGCG GATCA GCATG CCGCG GTGAA TACGT TCCCG GGCCT TGTAC
ACACC GCCCG TCACA CCACG GGAGT TTGCA ACACC CGAAG TCGGT GAGGT AACCG CAAGG AGCCA GCCGC
CGAAG GTGGG GTAGA TGACT GGGGT GAAGT CGTAA CAAGG TATCC GTACC GGAAG GTGCG GTTGG ATCAC
```

图 6-12　短短芽胞杆菌 JK-2 的 16S rDNA 序列

8. 芽胞杆菌生防菌 JK-2 脂肪酸 Sherlock MIS 的鉴定

菌株 JK-2 的全细胞脂肪酸气相色谱图见图 6-13。将菌株 JK-2 脂肪酸成分分析结果与 MIDI 数据库比对，发现菌株 JK-2 与短芽胞杆菌的匹配度最高，相关指数为 0.802。根据菌株 JK-2 的生理生化反应试验、16S rDNA 序列分析和 Sherlock MIS 鉴定的结果，判定该菌株为短芽胞杆菌。

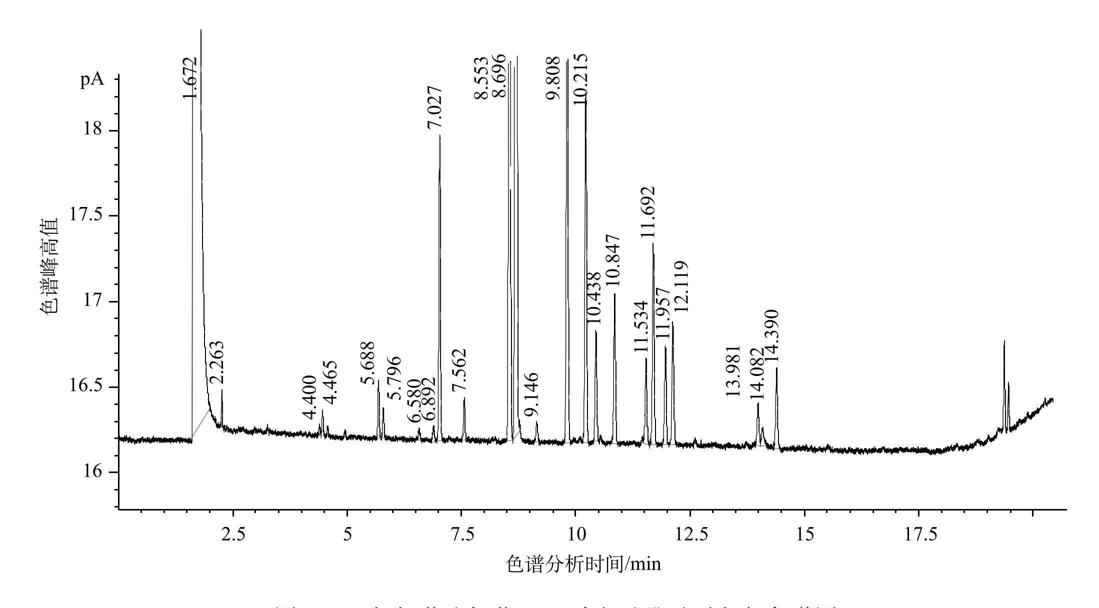


图 6-13　短短芽胞杆菌 JK-2 全细胞脂肪酸气相色谱图

9. 芽胞杆菌生防菌 JK-2 对西瓜枯萎病的防治效果

实验结果见表 6-9。在处理 30d 后，清水对照区的发病率高达 45.56%；JK-2 培养液处理组西瓜苗的发病率为 9.89%，防治效果达 78.26%。

表 6-9　短短芽胞杆菌 JK-2 培养液对西瓜枯萎病的防治效果

处理	调查株数	病株数	发病率/%	防治效果/%
JK-2 培养液	91	9	9.89	78.26
清水对照（CK）	90	41	45.56	

10. 讨论

芽胞杆菌是自然界广泛存在的一类细菌，其生理特征丰富多样，分布极广泛，是土壤和植物根际的重要微生物种群。一些菌株可以产生杆菌肽、大环脂、环脂和类噬菌体颗粒等十几种抗菌物质，在植物病害生物防治中被广泛应用（郝变青等，2001）。孔建等（1999）报道了枯草芽胞杆菌 B-903 对棉花枯萎病等多种土传镰刀菌和苹果轮纹病等具有抑菌活性，并通过试验证明用 B-903 菌液浸种可显著降低棉炭疽病等棉苗病害和菠菜枯萎病，防效分别可达 51.7%～69.4%和 68.1%～76.2%。晏立英等（2005）从油菜根际或叶围分离得到的枯草芽胞杆菌 Yl，对油菜菌核病病菌丝的生长具有明显的抑制作用；在温室盆栽试验和田间小区试验中，该菌株对油菜菌核病的防效达 92%。此外，芽胞杆菌能产生耐热抗逆的芽胞，这有利于生防菌剂的生产、剂型加工及在环境中存活、定殖与繁殖。

本研究从土壤中筛选得到的菌株 JK-2，不仅对西瓜、豇豆和辣椒等作物的枯萎病病菌具有较强的抑制作用，而且对大丽轮枝菌、番茄灰霉病病菌等其他植物病原真菌及青枯雷尔氏菌和禽致病性大肠杆菌的抑制作用也较强，说明该菌株的抑菌谱广，具有被开发为生物农药的潜力；经鉴定，该菌株为短短芽胞杆菌。短短芽胞杆菌是具有广谱抗菌活性的一种生防菌，该菌能以活体形式寄居到大量的真菌植物病原体中，包括灰色葡萄孢、苍耳单丝壳菌及终极腐霉；该菌可以通过分泌抗菌代谢物短杆菌肽 S（gramicidin S）和一种生物表面活性剂来抑制真菌或细菌的生长（李晶等，2006）。另外，短短芽胞杆菌分泌蛋白质能力强，而且胞外蛋白酶活性低，具有分泌表达外源蛋白的天然优势，可用于建立高效的原核分泌表达系统（纪明山等，2002；袁虹霞等，1998）；杨宇等（2006）报道短芽胞杆菌对原油中高碳链的饱和烷烃具有降解作用。目前，在国内还较少见到将短芽胞杆菌应用于植物病害生物防治方面的报道。菌株 JK-2 对植物枯萎病病菌的抑制作用已得到证实，至于该菌株的抑菌活性物质及其在生防上的应用，则有待于进一步的研究。

三、香蕉枯萎病芽胞杆菌生防菌的筛选

1. 概述

香蕉枯萎病是香蕉的一种“不治之症”，也是威胁全球香蕉种植业的最大杀手。香蕉枯萎病主要侵害维管束，是世界范围内香蕉产区的重要病害之一，是由古巴尖镰孢侵染而引起维管束坏死的一种毁灭性香蕉真菌病害和典型的土传病害，其病原属尖孢镰刀古巴专化型 *Fusarium oxyspomm* f. sp. *cubens*。刘炳钻和魏远竹（2009）通过建立香蕉枯萎病风险分析指标体系，分析香蕉枯萎病在中国的风险等级为高度危险，是我国外来生物的检疫对象，利用 Climex 软件预测出香蕉枯萎病在中国的很多省份都适合生长。随着香蕉枯萎病的蔓延，香蕉的产量逐年下降，化学农药的防治效果不理想，这就迫切需要研发一种微生物制剂来防治枯萎病，减少香蕉的产量损失。许多微生物都会分泌一些物质抑制其他生物的生长，利用微生物分泌的物质来防治植物病害，是世界各国生物研究人员的研究热点。

尽管香蕉枯萎病受到了世界各国的关注，但是对这种病的防治效果并不理想。而且如果一直大量使用化学农药，不仅成本高，也会造成严重的环境污染，对香蕉的品质、出口等也会造成一定的负面影响。利用微生物及其代谢产物、植物提取物等生物农药进行防治，使用对人体和生态环境无害的生防菌剂替代化学农药已成为世界范围内的研究发展方向。国内外有关生物防治香蕉枯萎病的研究也已稳步开展，近几年来有很多关于香蕉枯萎病生物防治的报道。例如，陈弟等（2008）研究发现枯草芽胞杆菌 B215 对香蕉枯萎病有很强的拮抗作用。荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）对香蕉枯萎病病原菌具有很高的抑制活性（Ayyadurai *et al.*，2006；Sukada *et al.*，2004），能定殖于香蕉根系中，诱导香蕉产生系统抗性。程亮等（2005）和黄小光等（2006）从香蕉土壤中分离出的假单胞菌对香蕉枯萎病病菌有明显的抑制作用，黄素芳等（2010）研究了从土壤中分离得到的一株短短芽胞杆菌胞外物质对香蕉枯萎病病原菌抑菌作用的稳定性。孙正祥等（2008）从采集的香蕉根际土壤中分离出对香蕉枯萎病菌病原菌 4 号小种具有强抑制作用的枯草芽胞杆菌 S-1，并找出该菌株理想的培养条件。余超等（2010）研究发现从香蕉体内分离到的一株铜绿假单胞菌对香蕉枯萎病有一定的防治效果，并能促进香蕉的生长。

从土壤中分离到了 300 余种芽胞杆菌，通过平板对峙生长法筛选到 4 株对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 具有明显抑制作用的芽胞杆菌，通过 16S rRNA 序列鉴定该 4 株芽胞杆菌生防菌为多粘类芽胞杆菌。作者研究了 4 株多粘类芽胞杆菌的生物学特性和脂肪酸特性，并从不同菌量、温度、pH 及紫外线照射时间等方面研究了 4 株生防菌对香蕉枯萎病病原菌 370 抗菌作用的稳定性，以期为开发防治香蕉枯萎病的微生物制剂提供依据。

2. 研究方法

1）材料。香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370，芽胞杆菌生防菌 FJAT-4543、FJAT-4544、FJAT-4506、FJAT-4539 采集信息见表 6-10。以上菌株均为本实验室分离得到。PDA 培

养基：去皮马铃薯 200g，滤液中加葡萄糖 20g、琼脂 18g，121℃灭菌 20min。NA 培养基：蛋白胨 10g、氯化钠 5g、牛肉浸膏 3g、琼脂 18g，pH7.2，121℃灭菌 20min。

表 6-10　芽胞杆菌生防菌的分离土样信息

菌株名称	分离地点	生境类型
FJAT-4506	甘肃省兰州市	黄河水底
FJAT-4539	西藏自治区林芝地区	草地
FJAT-4543	西藏自治区林芝地区	草地
FJAT-4544	西藏自治区林芝地区	草地

2）芽胞杆菌生防菌的分离与筛选。分离：采用稀释梯度法从土壤中分离芽胞杆菌。具体为称取 10g 土壤至装有 90ml 无菌水的三角瓶，摇床振荡 15min，使之充分溶解，即配成 10^{-1} 浓度；依次稀释配置成 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}；将稀释好的土样溶液放在 80℃水浴锅水浴 15min，期间振荡 2～3 次；吸取 100μl 水浴后的土壤溶液滴至 NA 平板中央，用涂布棒涂匀；将涂好的平板倒置于 30℃恒温箱中培养 2d。筛选：采用平板对峙法，将生长 5d 的香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 置于 PDA 平板中央，距离病原菌 2.5cm 处用牙签划线接种芽胞杆菌生防菌（划线长度大约 4cm）。28℃培养 3～5d 后观察记录抑菌带宽度，记录处理菌落直径和未处理菌落直径，计算抑制率。

抑菌率=（对照菌落直径−处理菌落直径）/对照菌落直径×100

3）芽胞杆菌生防菌的鉴定。PCR 扩增：采用细菌通用 16S rRNA-引物-9F 5′-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′(9-27)和 1542R 5′-AGAAAGGAGGTGATCCAG CC-3′（1542-1525），引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。4 株生防芽胞的基因组 DNA 提取方法采用水煮法。PCR 扩增体系为 25μl： 10×Buffer 2.5μl，dNTP Mixture（10mmol/L）0.5μl，引物 F 1.0μl，引物 R 1.0μl，*Taq* DNA 酶（2.5U/μl）0.3μL，DNA 1.0μl，无菌水 18.7μl。PCR 反应条件为 94℃预变性 180s，94℃变性 30s，55℃复性 90s，72℃延伸 600s，35 个循环。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。序列分析：4 株芽胞杆菌生防菌的 16S rRNA 由上海生物工程有限公司进行测序。所得序列经 NCBI 进行 Blastn 比对后，再经 ClustalX 对齐后，用软件 Mega4.0 进行聚类分析（方法为 Neighbour-Joining，Nucleotide： Jukes-Cantor），构建聚类树。

4）芽胞杆菌生防菌的生物学特性。生理生化特性指标具体参考东秀珠和蔡妙英（2002）编著的《常见细菌系统学鉴定手册》和 Gordn 等的《芽胞杆菌属》。

5）芽胞杆菌生防菌的脂肪酸特性。参照第五章第三节。

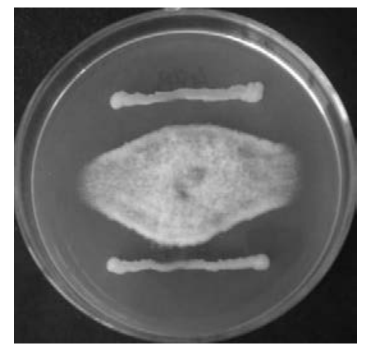
6）芽胞杆菌生防菌抗菌谱的测定。将初筛得到的抑菌效果最明显的 4 株生防芽胞采用双层培养基法进行抑菌谱的测定。供试病原菌 FJAT-370 菌液用 2 层无菌纱布过滤，除去菌丝，然后与冷却到 40～50℃的 0.8%的 PDA 培养基混合后倒在已凝固的 PDA 平板上。采用打孔法（打孔器直径约为 7mm）将初筛得到的芽胞杆菌生防菌菌液加入到上述培养基中，28℃培养 3d 后观察记录抑菌圈直径的大小。4 株多粘类芽胞杆菌的主要类型脂肪酸利用林营志等（2009）编写的软件处理后，然后运用 DPS 软件对 4 株多粘类芽

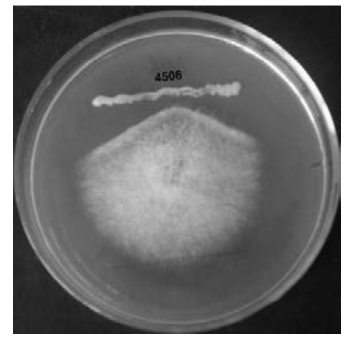
胞杆菌的脂肪酸和抑菌圈直径进行逐步回归分析。

7）芽胞杆菌生防菌抑菌作用稳定性的测定。菌液浓度对生防菌抑菌作用的影响：4 株芽胞杆菌生防菌于 NA 液体培养基、30℃、180r/min 培养 24h，得到发酵液，然后稀释 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}，观察不同浓度下对香蕉枯萎病病原菌的拮抗作用抑菌圈的直径大小。高温处理对生防菌抑菌作用的影响，将拮抗菌发酵液和发酵滤液分别在 60℃、90℃、121℃条件下加热处理 30min，采用抑菌圈法测定其抑菌活性。以原液作对照，每个处理 3 个重复，28℃培养 3d 后观察记录抑菌圈直径的大小。不同 pH 对病原菌的抑制作用，将拮抗菌发酵液和发酵滤液 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0，采用抑菌圈法测定其抑菌活性。以原液作对照，每个处理 3 个重复，28℃培养 3d 后观察记录抑菌圈直径的大小。紫外线照射时间对生防菌抑菌作用的影响：将细菌发酵液和发酵滤液分别倒入无菌培养皿中，分别置于 25W 紫外灯下 20cm 处照射 30min、60min、90min、120min，采用抑菌法测定其抑菌活性，以原液作对照，每个处理 3 个重复。28℃培养 3d 后观察记录抑菌圈直径的大小。

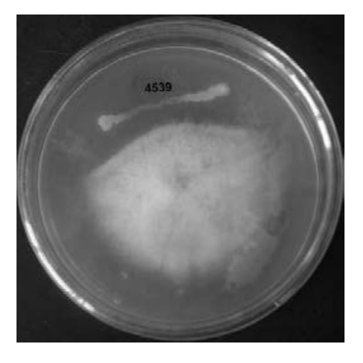
3. 香蕉枯萎病生防菌的筛选

通过平板对峙生长法筛选到 4 株对香蕉枯萎病有明显拮抗作用的芽胞杆菌（图 6-14），供试病原菌的浓度大约为 10^8 个/ml。


菌株 FJAT-4543 和菌株 FJAT-4544



菌株 FJAT-4506



菌株 FJAT-4539

图 6-14　香蕉枯萎病生防菌的筛选

4 株芽胞杆菌生防菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑菌带和抑菌率结果见表 6-11。菌株 FJAT-4543 的抑菌带最大，为 0.767cm，相应抑菌率也最大（42.2%）。菌株 FJAT-4539 的抑菌带（达 0.733cm）和抑菌率（41.1%）次之。

表 6-11　4 株芽胞杆菌生防菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑制作用

菌株编号	抑菌带/cm
FJAT-4543	0.767±0.120
FJAT-4544	0.483±0.231
FJAT-4506	0.483±0.198
FJAT-4539	0.733±0.214

菌株FJAT-4506和菌株FJAT-4544的抑菌带、抑菌率相同，分别为0.483cm和32.8%。4 株芽胞杆菌生防菌抑菌带的大小，从图 6-15 中可以看出 FJAT-4543 的抑菌率最大，FJAT-4539 的次之，FJAT-4544 和 FJAT-4506 的相同。

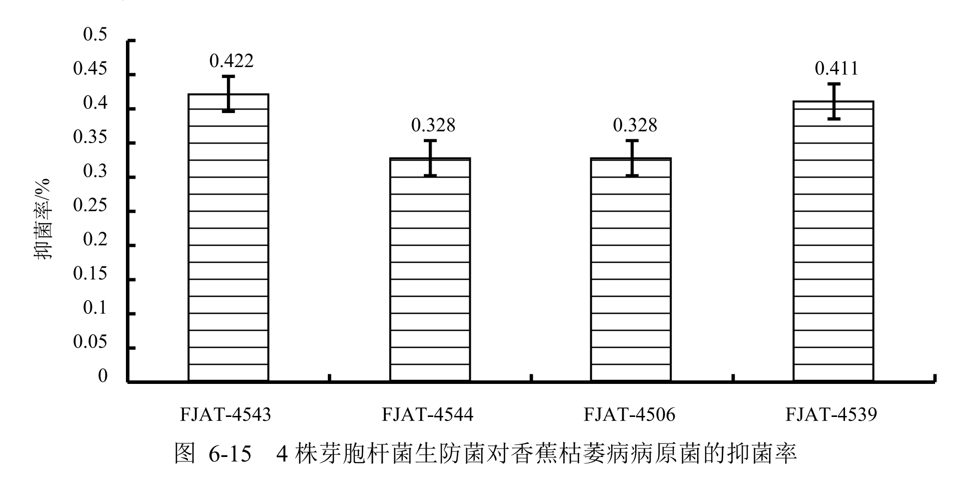


图 6-15　4 株芽胞杆菌生防菌对香蕉枯萎病病原菌的抑菌率

4. 香蕉枯萎病生防菌的鉴定

4株芽胞杆菌生防菌利用16S rRNA通用引物通过PCR扩增得到1.5kb左右的片段。经测序得到 4 株菌的 16S rRNA 序列，将 4 株菌的 16S rRNA 序列上传到 NCBI 上进行 Blast 比对，得到的比对结果基本上都为多粘类芽胞杆菌属。4 株菌的 16S rRNA 序列号为 JN016618-JN016621。利用软件 ClustalX 对齐序列和 Mega4.0 构建 4 株芽胞杆菌生防菌的聚类图（图 6-16）。4 株芽胞杆菌生防菌分为两大分支，菌株 FJAT-4506 和 FJAT-4543 为一类，菌株 FJAT-4544 和 FJAT-4539 为一类，均与多粘类芽胞杆菌标准菌株聚在一起（多粘类芽胞杆菌标准菌株AY320493、AB042063和AY359635 三条序列均选自NCBI）。因此，4 株菌被鉴定为多粘类芽胞杆菌。

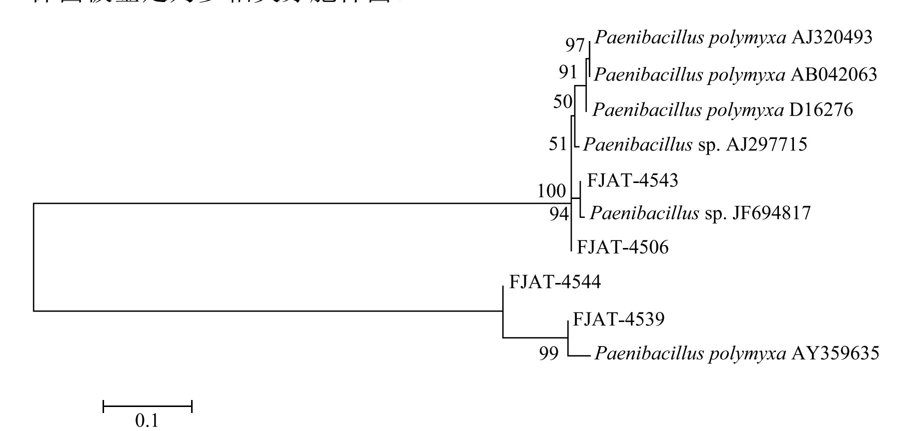


图 6-16　芽胞杆菌生防菌的聚类图

5. 芽胞杆菌生防菌的形态学特性

选取菌株 FJAT-4506 和 FJAT-4544，进行菌落形态和细胞形状观察。菌落形态学特征：菌落小，圆形，突起，紧贴培养基生长，较难刮取，具有黏性（图 6-17，图 6-19）。图 6-18 和图 6-20 为两株菌不同时期的细胞形状透射电镜观察图，从图中可以看出两株菌株的细胞为杆状，呈椭圆形，为营养细胞期，没有芽胞形成，图 6-20 芽胞为椭圆形，几乎充满整个细胞。

图 6-17　FJAT-4506

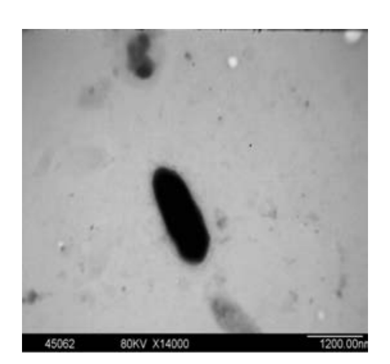


图 6-18　FJAT-4506

图 6-19　FJAT-4544

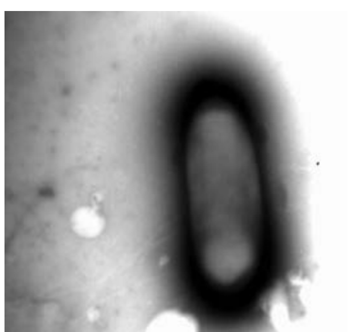


图 6-20　FJAT-4544

6. 芽胞杆菌生防菌的生理生化特性

4 株多粘类芽胞杆菌的生理生化特征见表 6-12。4 株多粘类芽胞杆菌的生理生化特征基本一致。4 株菌在温度 5℃时均没有生长，10～37℃时，除了菌株 FJAT-4539，都有生长现象，温度 50℃、55℃时，4 株菌都没有生长。4 株菌的 pH 生长一致，在 pH4.5 时均没有生长，pH5.7～9.5 时均能生长。NaCl 浓度为 2%～10%时，4 株菌都能生长。4 株菌都能利用丙二酸，但不能利用柠檬酸盐，接触酶反应除了菌株 4506 为阳性，其他均为阴性，蔗糖发酵为阳性，葡萄糖发酵除了菌株 FJAT-4506 为阴性，其他均为阳性，淀粉水解为阳性，MR 反应为阴性，VP 反应为阳性，硝酸盐还原为阳性，吲哚反应为阴性，明胶液化除了菌株 FJAT-4506 为阳性，其他为阴性。菌株 FJAT-4539 在培养温度为 10℃和 15℃时未见菌落出现，菌株 FJAT-4506 的生化指标接触酶反应、葡萄糖发酵和明胶液化反应与其他菌不同，可能是与分离土样的地点和生境类型有关。

表 6-12　4 株芽胞杆菌生防菌的生理生化特征

菌株编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
FJAT-4506	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
FJAT-4539	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
FJAT-4543	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
FJAT-4544	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
菌株编号	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
FJAT-4506	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
FJAT-4539	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
FJAT-4543	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
FJAT-4544	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-

注：1. 温度 5℃；2. 10℃；3. 15℃；4. 30℃；5. 37℃；6. 50℃；7. 55℃；8. pH 4.5；9. pH 5.7；10. pH 7.2；11. pH 8.0；12. pH 9.5；13. NaCl 2%；14. NaCl 5%；15. NaCl 7%；16. NaCl 10%；17. 丙二酸利用；18. 柠檬酸盐利用；19. 接触酶；20. 氧化酶；21. 蔗糖发酵；22. 葡萄糖发酵；23. 淀粉水解；24. MR；25. VP 反应；26. 硝酸盐还原；27. 吲哚反应；28. 明胶液化

7. 芽胞杆菌生防菌的脂肪酸特性

脂肪酸含量在 5%以下的忽略不计。由表 6-13 可以看出，4 株多粘类芽胞杆菌的主要脂肪酸类型相同，共有 11 种脂肪酸，每种脂肪酸的含量基本一致。主要脂肪酸为 15:0 ANTEISO（含量为 45%～51%），15:0 ISO（含量为 12%～17%），16:0（含量为 13%～16%），16:0 ISO（含量为 14%～17%），17:0 ANTEISO（含量为 15%～17%）。脂肪酸 15:0 ANTEISO 含量占总脂肪酸含量的近 1/2，比例较大，其他几种脂肪酸的含量基本一致。多粘类芽胞杆菌标准菌株的主要脂肪酸为 15:0 ANTEISO，其他脂肪酸含量较低。

表 6-13　4 株多粘类芽胞杆菌的脂肪酸类型和含量（%）

脂肪酸	FJAT-4506	FJAT-4539	FJAT-4543	FJAT-4544
14:0	8.9681	7.1053	8.2318	8.4513
14:0 ISO	9.6154	7.6671	9.0974	9.1158
15:0 ANTEISO	45.1089	51.0963	49.8881	50.3597
15:0 ISO	16.3982	16.6086	12.3711	13.3609
16:0	17.7261	13.3864	15.2517	15.8069
16:0 ISO	16.8063	13.7755	15.7960	15.6973
16:1ω11c	7.2440	7.8385	9.2431	9.3866
16:1 W7C ALCOHOL	4.0140	4.7993	5.5041	5.5041
17:0 ANTEISO	17.4776	15.7522	17.1041	14.9211
17:0 ISO	13.1168	11.2110	8.7421	9.0238
18:0	4.2142	4.5161	7.0585	5.4437

8. 芽胞杆菌生防菌的抑菌作用

4 株多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌的抑菌谱见表 6-14。从表中可以得出菌株 FJAT-4539 的抑菌圈直径最大，达 21.17±0.13mm，对香蕉枯萎病病原菌有较好的抑制效果。其次为菌株 FJAT-4543，抑菌圈直径为 19.95±0.80mm。菌株 FJAT-4506 和 FJAT-4544 的抑菌圈直径分别为 19.29±1.18mm 和 17.14±0.39mm。

表 6-14　4 株多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑菌作用

菌株编号	抑菌圈直径/mm			
	重复 I	重复 II	重复 III	均值
P. polymyxa FJAT-4543	20.86	19.67	19.33	19.95±0.80
P. polymyxa FJAT-4544	17.53	17.14	16.76	17.14±0.39
P. polymyxa FJAT-4506	18.04	20.39	19.44	19.29±1.18
P. polymyxa FJAT-4539	21.11	21.08	21.32	21.17±0.13

4 株多粘类芽胞杆菌的主要类型脂肪酸利用软件处理后（林营志等，2009），运用 DPS 软件对 4 株多粘类芽胞杆菌的脂肪酸和香蕉枯萎病病原菌抑菌圈直径进行逐步回归分析得出以下公式 Y=17.6868 − 2.1438X_1+1.1804X_9（r=0.99），Y 为抑菌圈直径，X 为脂肪酸类型，X_1 为 14：0；X_9 为 17：0 ANTEISO。由公式可以得出 4 株多粘类芽胞杆菌的抑菌圈直径大小与脂肪酸 14：0 和 17：0 ANTEISO 有一定的相关性（表 6-15）。抑菌圈直径与脂肪酸 14：0 呈负相关，与 17：0 ANTEISO 呈正相关。

表 6-15　4 株多粘类芽胞杆菌的脂肪酸与对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 抑菌直径相关性

脂肪酸	菌株 FJAT-4506	菌株 FJAT-4539	菌株 FJAT-4543	菌株 FJAT-4544
14：0	8.9681	7.1053	8.2318	8.4513
14：0 ISO	9.6154	7.6671	9.0974	9.1158
15：0 ANTEISO	45.1089	51.0963	49.8881	50.3597
15：0 ISO	16.3982	16.6086	12.3711	13.3609
16：0	17.7261	13.3864	15.2517	15.8069
16：0 ISO	16.8063	13.7755	15.7960	15.6973
16：1 W11C	7.2440	7.8385	9.2431	9.3866
16：1 W7C ALCOHOL	4.0140	4.7993	5.5041	5.5041
17：0 ANTEISO	17.4776	15.7522	17.1041	14.9211
17：0 ISO	13.1168	11.2110	8.7421	9.0238
18：0	4.2142	4.5161	7.0585	5.4437
抑菌圈直径/mm	19.2900	21.1700	19.9500	17.1400

9. 影响芽胞杆菌生防菌抑菌作用的因素

1）菌液浓度对生防菌抑菌作用的影响。由表 6-16 可以看出，随着菌液浓度的稀释，4 株多粘类芽胞杆菌的抑菌直径逐渐变小。4 株多粘类芽胞杆菌原液对香蕉枯萎病病原菌的抑菌圈直径大小为：菌株 FJAT-4539 >菌株 FJAT-4543>菌株 FJAT-4506>菌株 FJAT-4544，当菌液稀释 10 倍时，4 株菌的抑菌圈直径大小为：菌株 FJAT-4539 >菌株 FJAT-4543>菌株 FJAT-4544>菌株 FJAT-4506，稀释 100 倍时，只有菌株 FJAT-4539 对病原菌有明显的抑制作用。

表 6-16　不同浓度下 4 株多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑菌作用

菌株编号	浓度 10^{-1}	浓度 10^{-2}	浓度 10^{-3}
FJAT-4543	19.95±0.80ab	13.74±1.25b	0b
FJAT-4544	17.14±0.39c	12.72±0.15b	0b
FJAT-4506	19.29±1.18b	12.25±1.16b	0b
FJAT-4539	21.17±0.13a	18.49±0.90a	13.39±2.23a

注：a、b、c 表示同一浓度不同菌株之间的抑菌差异，$P<0.05$ 为显著性差异

2）高温处理对生防菌抑菌作用的影响。4 株多粘类芽胞杆菌的发酵液分别经 60℃、90℃、121℃处理后，均失去了抗菌活性。由此可以推测 4 株多粘类芽胞杆菌的抑菌物质对温度极其敏感，温度升高很容易变性失活，对于抗菌物质具体成分和结构有待进一步研究。

3）不同 pH 对病原菌的抑制作用。4 株多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑制作用结果见表 6-17。pH 对抑菌作用的效果影响很大，菌液过酸或过碱（pH4～5，pH10～11）时，4 株多粘类芽胞杆菌对病原菌均无抑菌作用。4 株菌都是在 pH6～9 时具有较强的抑菌作用，菌株 FJAT-4543 和菌株 FJAT-4544 在 pH6 时抑菌圈直径最大，菌株 FJAT-4506 和菌株 FJAT-4539 在 pH9 时抑菌圈直径最大。随着 pH 的变化，4 株多粘类芽胞杆菌的抑菌圈直径也发生相应的变化。菌株 FJAT-4543 和菌株 FJAT-4544 随着 pH 的增大抑菌圈直径先变小后变大，菌株 FJAT-4506 和菌株 FJAT-4539 随着 pH 的增大抑菌圈直径有逐渐增大趋势，抑菌圈直径随 pH 的这种变化可能与抗菌物质的性质有一定的相关性。

表 6-17　不同 pH 下 4 株多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 抑菌圈直径

菌株	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11
P. polymyxa FJAT-4543	0e	0e	22.71±0.180a	18.06±0.33c	12.70±0.54d	20.27±0.34b	0e	0e
P. polymyxa FJAT-4544	0d	0d	22.13±0.280a	18.46±0.50b	16.91±0.01c	21.37±0.03a	0d	0d
P. polymyxa FJAT-4506	0d	0d	13.59±0.010c	16.75±0.02b	16.77±0.08b	18.04±0.04a	0d	0d
P. polymyxa FJAT-4539	0e	0e	11.60±0.003d	14.79±0.11c	16.64±0.03b	20.27±0.50a	0e	0e

注：a、b、c、d、e 表示同一菌株不同 pH 之间的抑菌差异，$P<0.05$ 为显著性差异

4）紫外线照射时间对生防菌抑菌作用的影响。从表 6-18 中可以看出：不同紫外线照射时间对 4 株多粘类芽胞杆菌抑菌作用的影响不同。菌株 FJAT-4543 和菌株 FJAT-4539 的抑菌作用不受紫外线照射时间的影响，不同照射时间抑菌圈直径和对照相比没有差异。菌株 FJAT-4544 紫外线照射 30min 时抑菌圈直径和对照相比有显著差异，在紫外线照射 30min 时抑菌圈直径最大，其他时间都没有差异。菌株 FJAT-4506 经紫外线照射 90min 时抑菌圈直径达最大，和对照相比有差异显著，其他时间均无差异。

表 6-18　不同紫外线照射时间对 4 株芽胞杆菌生防菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 抑菌作用的影响

菌株	30min	60min	90min	120min	0min
P. polymyxa FJAT-4543	21.40±0.27aA	20.27±0.04aA	20.72±0.31aA	20.47±0.003aA	19.95±0.46aA
P. polymyxa FJAT-4544	19.96±1.13aA	17.25±0.14bB	17.74±0.42bB	17.46±0.33bB	17.14±0.22bB
P. polymyxa FJAT-4506	20.97±0.28aAB	18.21±0.66bC	21.45±0.32aA	18.92±0.01bC	19.29±0.68bBC
P. polymyxa FJAT-4539	21.82±0.21aA	20.327±0.13bA	22.09±0.27aA	21.55±0.20abA	21.17±0.08abA

注：　小写字母 a、b、c 表示同一菌株不同紫外线照射时间之间的抑菌差异，$P<0.05$ 为显著性差异，大写字母 A、B、C 表示极显著性差异 $P<0.01$

10. 讨论

16S rRNA 基因具有高度的保守性，其进化速度十分缓慢，被称为细菌的活化石。由于 16S rRNA 基因的长度合适，是目前最常用来作为细菌鉴定的核苷酸序列，其可靠性比常规的生理生化特征要高得多，已成为细菌分类的“金指标”。本研究利用 16S rRNA 基因测序，对 4 株香蕉枯萎病生防菌进行细菌分类学鉴定。将测序所得序列在 NCBI 上 Blast 比对得出这 4 株菌和多粘类芽胞杆菌相似性达 99%，4 株芽胞杆菌被鉴定为多粘类芽胞杆菌。

多粘类芽胞杆菌是 Ash 等（1994）从芽胞杆菌属内分化出来的，以此为模式种建立了类芽胞杆菌属。多粘类芽胞杆菌具有芽胞杆菌属的种的特征，能形成芽胞，芽胞具有极强的抗性。近几年来关于多粘类芽胞杆菌的研究一直处于上升趋势。多粘类芽胞杆菌能分泌多种抗菌物质，如多肽、蛋白质、核苷和酚类等，对多种病原菌具有较强的抑制活性，这些物质能显著提高植株的抗病性（童蕴慧等，2004；Beatty and Suan，2002）。同时，多粘类芽胞杆菌具有从土壤向植物根部移动定殖的能力，并能通过固氮和溶磷作用为宿主植物提供营养成分，也能促进植株生长，提高植物的产量，是一种较好的生防促生菌（Timmusk *et al*., 1999），已在农业上广泛应用。虽然研究人员对多粘类芽胞杆菌的研究很多，如马红娟等（2008）通过平板对峙培养，筛选出对香蕉枯萎病病菌有拮抗作用的细菌 6 株，其中芽胞杆菌 B05 抑菌作用最稳定、抑菌活性最高，葛慈斌等（2009）研究了菌株 JK-2 对尖孢镰刀菌的抑制特性。但是关于多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病的防治研究并不多，据 Dijksterhu 等（1999）研究发现多粘类芽胞杆菌对镰刀菌的抑制是活菌体直接起抑制作用，与本节的研究结果一致。

作者从土壤中分离的芽胞杆菌筛选到 4 株对香蕉枯萎病病原菌有明显抑制作用的多

粘类芽胞杆菌，并从不同角度对 4 株生防菌进行了研究。4 株多粘类芽胞杆菌的生物学特性基本相似，但也有一定的差异。菌株 FJAT-4539 和菌株 FJAT-4506 某些生理生化特性与其余两株菌株不同，而菌株 FJAT-4543 和菌株 FJAT-4544 分离于同一份土壤，这可能与土样类型有关。不同土壤的理化性状不同，对微生物的生长具有一定的影响，从而造成同种不同菌株的生理生化特性的差异。

脂肪酸是微生物细胞组分中一种稳定而富有的重要成分，它和细菌的遗传变异、毒力、耐药性等有极为密切的关系，国内外很多研究人员通过脂肪酸类型对微生物进行研究。例如，蓝江林等（2009）利用脂肪酸手段分析茄子作物内生菌的多样性，刘波等（2010）研究了水稻根际土壤中微生物多样性（刘波等，2010）。王秋红等（2007）检测了 40 株青枯雷尔氏菌的脂肪酸，发现青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与致病性之间存在相关性，但关于生防菌脂肪酸类型和抑菌相关性的文章还未见报道。利用微生物脂肪酸鉴定系统 Sherlock 对 4 株芽胞杆菌生防菌进行检测，检测结果表明，4 株多粘类芽胞杆菌的主要脂肪酸共有 11 种，其中占比例最多的脂肪酸为 15:0 ANTEISO，其含量为 45%～50%。运用 DPS 软件发现，4 株多粘类芽胞杆菌抑菌圈直径与脂肪酸 14:0 和 17:0 ANTEISO 具有相关性。据此可以推断脂肪酸可以成为多粘类芽胞杆菌生理小种的分化指标。

多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌抑菌作用的研究方面的文献较少见报道，对不同条件下多粘类芽胞杆菌对病原菌抑菌特性的研究更是少之又少。通过不同菌液浓度、温度、pH 及紫外线照射等因素，作者初步研究了这 4 株多粘类芽胞杆菌对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑菌特性。不同的菌液浓度对香蕉枯萎病病原菌 FJAT-370 的抑制作用效果也不同。当菌液浓度稀释 100 倍时，只有菌株 FJAT-4539 对菌株 FJAT-370 有明显的抑制作用。由此可以推断，菌株 FJAT-4539 对香蕉枯萎病病原菌具有强有效的抑制作用。4 株芽胞杆菌生防菌的抑菌作用对温度极度敏感，虽然在室温时对病原菌的抑制效果很明显，但是一经加热 4 株菌株均失去抑菌活性。由此可说明 4 株菌株的抑菌物质可能是某种蛋白质，而且这种蛋白对温度极度敏感，一经加热极易失去活性，需要经过一定菌株诱导改良方可应用于实践。介质 pH 影响生活环境中营养物质的可给态和有毒物质的毒性；影响菌体细胞膜的电荷性质、膜的稳定性及膜对物质的吸收能力；使菌体表面蛋白质变性或水解，从而影响微生物的生长。4 株多粘类芽胞杆菌在 pH9 时抑菌效果最明显，能适应于环境中碱性条件的土壤，如应用于盐碱地等碱性土壤。4 株芽胞杆菌生防菌对紫外线照射都有较强的耐受力，紫外线照射时抑菌作用没有减弱，菌株 FJAT-4506 和菌株 FJAT-4544 甚至比正常条件下抑菌作用还强，但其活性物质对热敏感性太强，如果应用于实践中需要进行一定的改良。

综合本研究所有实验结果，表明菌株 FJAT-4539 对香蕉枯萎病病原菌 370 具有很强的抑制作用，且抑制效果要高于其他 3 株菌株。因此该菌株有望开发为香蕉枯萎病生物防治的有效资源，对于该菌株的抑菌物质活性和结构及在土壤中的定殖有待进一步的深入研究。

第二节　芽胞杆菌生防菌在番茄植株体内的定殖特性

一、概述

内生生防菌可以在植株体内定殖，从而减少外界干扰的影响，而能表现更好的生防效果，因此确定生防菌的内生性并研究其在植株体内的定殖能力对充分发挥生防菌的防效有重要意义。绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的发现为研究植物和微生物之间的关系提供了一个极为有效的工具，对青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A的*gfp*成功标记使得对生防菌活体在番茄植株体内的定殖观察成为可能。试验方法如下。

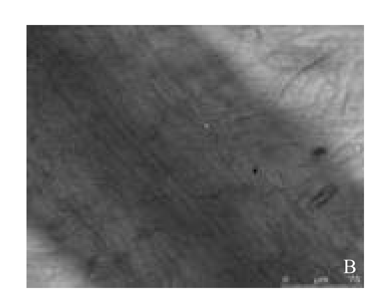
二、研究方法

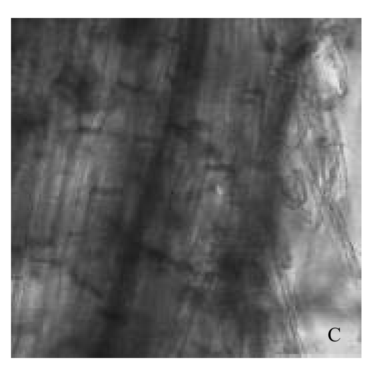
1）供试生防菌。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的 *gfp* 标记菌株蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20，由福建省农业科学院农业生物资源所生物农药研究中心提供。供试番茄：品种为‘瑞潘 007’。

2）蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在番茄植株内的定殖观察。将蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20 活化于 LA 培养基上，置于 30℃条件下培养 48h，得到浓度约为10^8CFU/ml 的菌液，用无菌水将菌液稀释，用浓度为 10^2CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20 菌液对番茄进行浸根培养，2 天后用蒸馏水冲洗番茄根系，切片观察。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 及其标记菌株蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在番茄内定殖浓度的测定：分别用浓度为 50ml 10^6CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液对番茄盆栽苗进行灌根处理，每处理 10 盆，重复 3次。处理后 50 天分别对番茄根、茎、叶内的生防菌进行回收培养，统计回收菌量。回收方法参照易有金等（2007）的内生枯草芽胞杆菌在烟草上定殖的回收。

三、芽胞杆菌番茄植株体内定殖特性

蓝紫光下，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在植株体内发出清晰的绿色荧光。由图 6-21 可以看出，采用浸根法用蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液处理番茄苗，利用激光共聚焦显微镜可以观察到菌体在根系内的分布。有的蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20 菌体在根毛外（图 6-21A），有的在根毛与根表的交接处（图 6-21B），有的已经进入到根系内部（图 6-21C）。





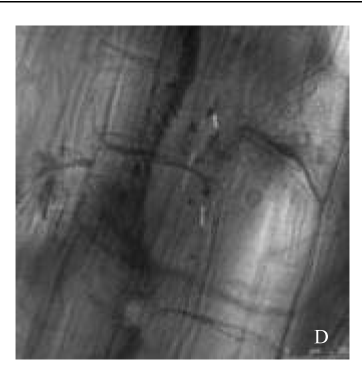


图 6-21　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A：pCM20 在番茄植株内的定殖

A. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在根外；B. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在根表；
C. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在根内；D. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在根系细胞内

四、芽胞杆菌番茄植株内定殖浓度

由图 6-22 可以看出，采用灌根处理法，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 及其标记菌株蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在番茄植株根、茎、叶内均能很好地定殖，其中根部回收的菌量最大，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 从根部回收的菌量浓度分别为 8.80×10^4CFU/g 和 2.20×10^5CFU/g，茎部、叶片中递减，在茎部回收菌量分别为 8.75×10^4CFU/g 和 6.25×10^4CFU/g，叶片内回收菌量分别为 6.60×10^3CFU/g 和 3.07×10^4CFU/g。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在根部和叶片内的定殖浓度高于蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A，而蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 在茎部的定殖浓度比蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 高。

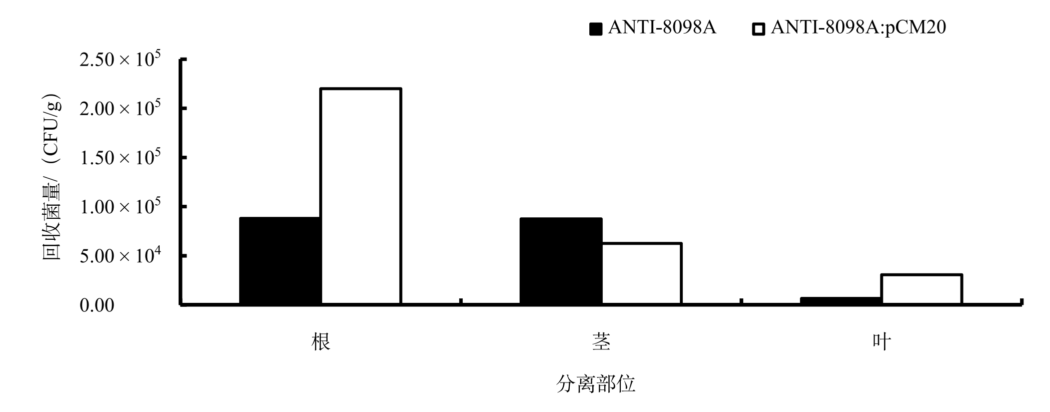


图 6-22　从番茄植株不同部位回收的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和
蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 数量

五、讨论

青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 是从番茄病区根系土壤中分离到的，经试验进一步发现，该菌株可以很好地在番茄植株体内定殖，主要以二联体或三联体形式存

在，与曹宜等（2003）的研究结果一致。施用蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 后 50d 对番茄不同部位的生防菌进行回收，发现根内生防菌含量最高，达 10^4～10^5CFU/g，茎部、叶片中递减，分别能达 10^4CFU/g 和 10^3CFU/g，这与龙良鲲和肖崇刚（2003）的研究结果一致。李术娜等（2005）报道棉花黄萎病拮抗细菌 2-70 在施入土壤中 25d 至 5 个月，该菌在棉花根内保持 10^3CFU/g。胡小加等（2009）研究枯草芽胞杆菌 Tu-100 在油菜体内的定殖，结果表明，接菌 30d 后生防菌在根内保持一个较稳定的浓度，约为 10^2CFU/g，而在茎部和叶片内检测不到生防菌。通过与前人研究比较发现，青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 在番茄植株体内具有很强的定殖能力。作为一株从病区番茄根际土壤中分离到的生防菌，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 既可以在土壤中生存，又能很好地定殖于番茄植株的各个部位，显示了良好的应用前景。

第三节　芽胞杆菌生防菌在不同性质土壤中的定殖

一、概述

青枯病是一种土传病害，因此对青枯病的生物防治来说，拮抗细菌在土壤中的定殖能力与防效关系密切，而生防菌的定殖又会对土壤微生物结构群落产生怎样的影响，值得探讨。基因标记为研究生防菌的定殖动态提供了方便，测定土壤微生物多样性的方法有多种，常用的有传统的平板稀释法，磷脂脂肪酸（PLFA）因其灵敏度高、分析方法简单而广泛应用于土壤微生物学研究。因此，本节结合传统的稀释涂板法，同时采用 PLFA 分析标记生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在土壤中的定殖及其对土壤微生物群落结构的影响。试验方法如下。

二、研究方法

1）供试生防菌。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的 *gfp* 标记菌株蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20，由福建省农业科学院农业生物资源所生物农药研究中心提供。供试土壤：南平建瓯玉山镇榧村沙壤土，南平建瓯小桥镇山脚红壤土，南平建瓯小桥镇烟草地土壤，南平建瓯黄墩七里街茄子地土壤，南平建瓯黄墩七里街花生地土壤。

2）土壤理化性质的测定。土壤理化性质由福建省农业科学院土壤肥料研究所测定。土样的处理，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液的制备同上。将蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液稀释到 10^6CFU/ml，每份土壤取 250g 于盆钵中，用 50ml 浓度为 10^6CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液浇灌处理，共 5 个处理，每处理重复 3 次，对照用清水代替蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液。处理前取样一次，此后 1d、2d、4d、8d、16d、32d 取样分离统计各处理中的细菌、真菌及放线菌的种类及数量，其后 30d 取样一次，统计各处理中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的浓度。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在不同土壤中的定殖消长动态：定期取样，用加有浓度为 500μg/ml 红霉素的 LA 平板对土壤中的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 进行分离培养。5 种土壤中分离到的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的 *gfp* 基因检测，160d 从 5

种土壤中分离到的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 中，每个处理随机挑取 9 个单菌落进行纯化，30℃培养 48h，备用。DNA 的提取：采用水煮法，用接种环挑取两环菌体于 1.5ml 已灭菌离心管中，加入 1μl 1mol/L 的 NaOH 溶液，2.5μl 2%的 SDS 溶液，16.5μl 无菌双蒸水，95℃水浴 15min，再加入 180μl 无菌双蒸水，–20℃保存。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 DNA 的 PCR 扩增：采用特异引物 *gfp1* 和 *gfp2* 对不同处理中分离到的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的 DNA 片段进行 PCR 扩增，PCR 反应总体积为 25μl。反应体系为：10×PCR Buffer 2.5μl，*Taq* 酶 0.3μl，10mmol/L dNTP 0.5μl，*gfp1*（10pmol）1.0μl，*gfp2*（10 pmol）1.0μl，无菌水 19.7μl。反应程序为：94℃预变性 5min，循环的程序为 94℃变性 30s，52℃复性 30s，72℃延伸 90s，共 30 个循环，最后 72℃延伸 10min，扩增结束后，取 5μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳以检查扩增结果。

三、土壤理化性质的测定

处理一和处理二为未种植过作物的生土，处理三到处理五均为栽培土，由表 6-19 可以看出，5 种土壤的理化性质有所不同，栽培土中速效氮、速效磷、速效钾、有机质及有机碳的含量普遍高于生土，pH 也有所区别，处理一和处理二的土壤 pH 偏酸性。

表 6-19　5 种土壤的理化性质

处理	pH	全氮/%	全磷/%	全钾/%	速效钾/（mg/kg）	速效氮/（mg/kg）	速效磷/（mg/kg）	有机质/%	有机碳/%
处理一	5.91	0.081	0.048	2.95	54.5	109.6	11.57	0.748	0.434
处理二	6.46	0.020	0.015	1.97	44.1	16.6	5.5	0.164	0.095
处理三	7.02	0.165	0.130	1.52	1094.4	151.2	140.3	2.252	1.306
处理四	6.06	0.142	0.153	0.62	131.5	143.6	230.4	1.494	0.867
处理五	6.78	0.132	0.134	0.63	267.8	133.1	137.5	1.464	0.849

利用表 6-19 构建矩阵，以处理纵表头为样本，以处理横表头为指标，以欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类。结果见表 6-20 和图 6-23。供试土壤处理一（*A*）取自南平建瓯玉山镇榧村沙壤土，未种植过作物，偏酸性，有机质含量低，通透性强；处理二（*B*）取自南平建瓯小桥镇山脚红壤土，未种植过作物，偏中性，有机质含量很低，通透性差；处理三（*C*）取自南平建瓯小桥镇烟草地土壤，种植烟草作物，中性，有机质含量很高，速效钾含量比其他土壤高 5～20 倍，通透性适中，属水田，有水旱轮作；处理四（*D*）取自南平建瓯黄墩七里街茄子地土壤，种植茄子作物，偏酸性，有机质含量较高，速效钾含量中等，通透性适中，属农田旱地；处理五（*E*）取自南平建瓯黄墩七里街花生地土壤，种植花生作物，偏中性，有机质含量很高，速效钾含量中等，通透性适中，属旱地。

分析结果表明，处理一（*A*）和处理二（*B*）归为一类，特点为有机质含量低，速效钾低，土壤偏酸性；处理四（*D*）和处理五（*E*）归为一类，特点为有机质含量中等，速效钾中等，土壤偏酸性；处理三（*C*）自成一类，特点为有机质含量高，速效钾特别高，

土壤中性。

表 6-20　5 种土壤理化性质的欧氏距离

处理	欧氏距离				
	1：*A*	2：*B*	3：*C*	4：*D*	5：*E*
1：*A* （处理一）	0.000	93.786	104.900	234.473	248.826
2：*B* （处理二）	93.786	0.000	106.700	272.676	284.679
3：*C* （处理三）	104.900	106.700	0.000	967.137	826.804
4：*D* （处理四）	234.473	272.676	967.137	0.000	165.284
5：*E* （处理五）	248.826	284.679	826.804	165.284	0.000

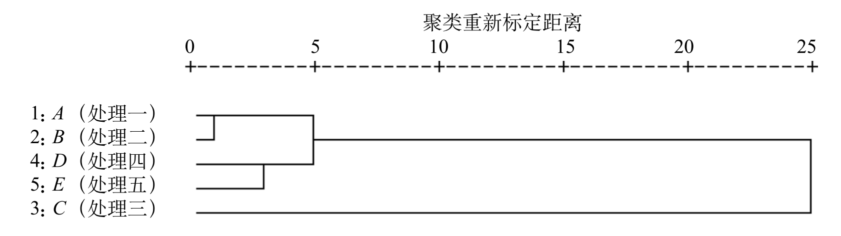


图 6-23　5 种土壤理化性质的聚类分析

四、芽胞杆菌在土壤中的数量动态变化

首先进行蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 *gfp* 基因的鉴定。由图 6-24 可以看出，1～45 号菌株的 *gfp* 鉴定结果产物均为 700bp 左右，说明从 5 种土壤中再分离到的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 均带有最初标记的 *gfp* 基因。其中 1～9、10～18、19～27、28～36 和 37～44 分别为第 160 天从处理一到处理五中分离到的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20，随机挑取单菌落纯化培养后提取的 DNA 的 *gfp* 鉴定结果，45 为从

图 6-24　5 种土壤中分离到的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的 *gfp* 鉴定

菌种库中活化的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 标准菌株的 *gfp* 鉴定结果，作为阳性对照，CK 为无菌双蒸水对照。

其次进行不同土壤中芽胞杆菌数量统计，统计结果见表 6-21。5 种土壤中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的数量动态变化由图 6-25 可以看出，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 在不同土壤中的定殖能力差异较大，处理三、处理五中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 含量最多，达 10^6CFU/g，处理四中含量次之，约 10^5CFU/g，处理一和处理二中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 含量最少，浓度达 10^2～10^4CFU/g。到处理后 60d，各处理中含量基本保持稳定，到 90d，各处理中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 含量骤降，到 130d、160d 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 含量有所增加，略低于最初处理时土壤中的含量。

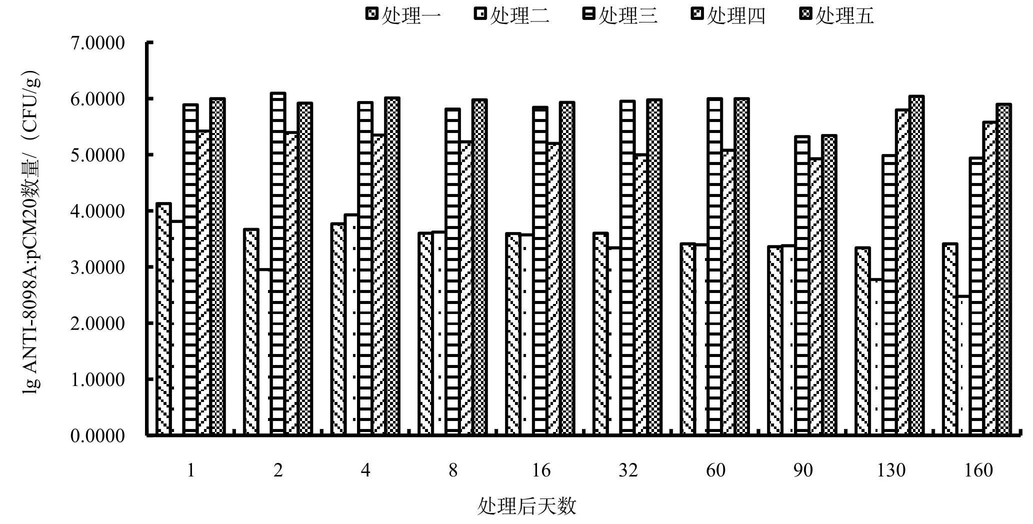


图 6-25　5 种土壤中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的数量动态变化

表 6-21　5 种土壤中蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 的数量动态变化对数值

处理天数	处理一（*A*）	处理二（*B*）	处理三（*C*）	处理四（*D*）	处理五（*E*）
1	4.1303	3.8129	5.8893	5.4232	6.0000
2	3.6721	2.9542	6.0969	5.3979	5.9191
4	3.7709	3.9294	5.9294	5.3522	6.0128
8	3.6021	3.6232	5.8129	5.2304	5.9777
16	3.5966	3.5740	5.8451	5.2041	5.9345
32	3.6021	3.3424	5.9542	5.0000	5.9777
60	3.4150	3.3979	6.0000	5.0792	6.0000
90	3.3617	3.3802	5.3222	4.9294	5.3424
130	3.3424	2.7782	4.9868	5.7993	6.0414
160	3.4150	2.4771	4.9395	5.5798	5.8976

利用表6-21构建矩阵，以处理天数为指标，以不同土壤类型为样本，欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类，结果见图6-26。由图6-26可以看出，蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20在不同土壤中定殖能力的时间变化与上述数量变化相近，处理一（*A*）和处理二（*B*）归为一类，特点为有机质较低，速效钾低，土壤偏酸性；处理四（*D*）、处理五（*E*）以及处理三（*C*）归为一类，特点为有机质含量较高，速效钾较高，土壤偏酸性。

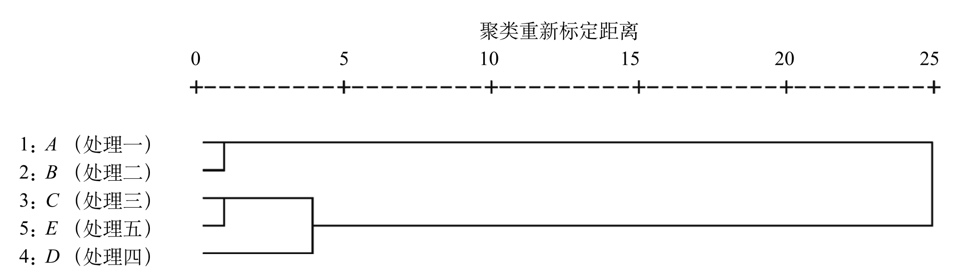


图6-26　基于蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20的数量动态变化的5种土壤聚类分析

利用表6-21构建矩阵，以处理纵表头为样本，以处理横表头为指标，以欧氏距离为尺度，用类平均法进行系统聚类，结果见图6-27。聚类结果分3类，即处理1～60d以前为第1类，处理90d为第2类，处理130～160d为第3类。第1类适应期，处理60d以前，各处理中含量基本保持稳定；第2类转折期，到第90天，为一转折点，各处理中蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20含量骤降；第3类恢复期，到第130天、第160天蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20含量有所增加，略低于最初处理时土壤中的含量。

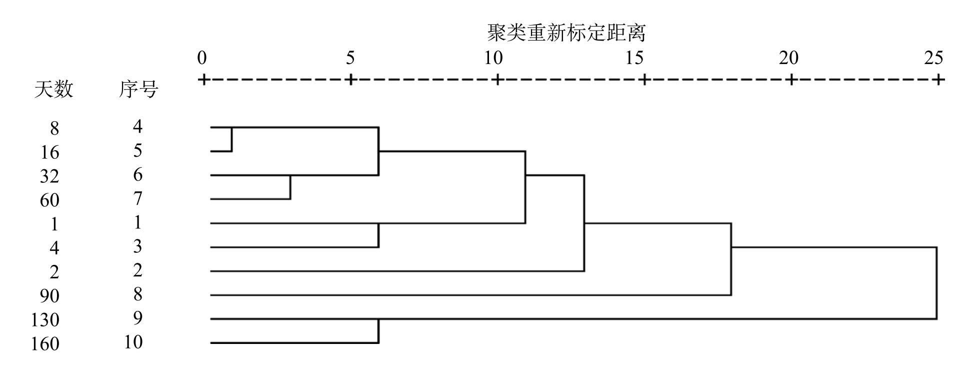


图6-27　基于5种土壤的蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20数量动态变化的聚类分析

五、芽胞杆菌对土壤中细菌种群的影响

蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20对不同性质土壤中细菌种类和数量的影响由图6-28～图6-32可以看出，在用蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A:pCM20菌液处理前，各处理土壤中，处理组和对照组细菌的种类和数量均处于同一水平，其中处理三土壤中自带细菌种类和数量最多，处理四、处理五次之，处理一和处理二中细菌含量较少。处理一在处理后第4天细菌数量迅速增多，处理二在处理后第8天细菌数量迅速增多，而处理三、

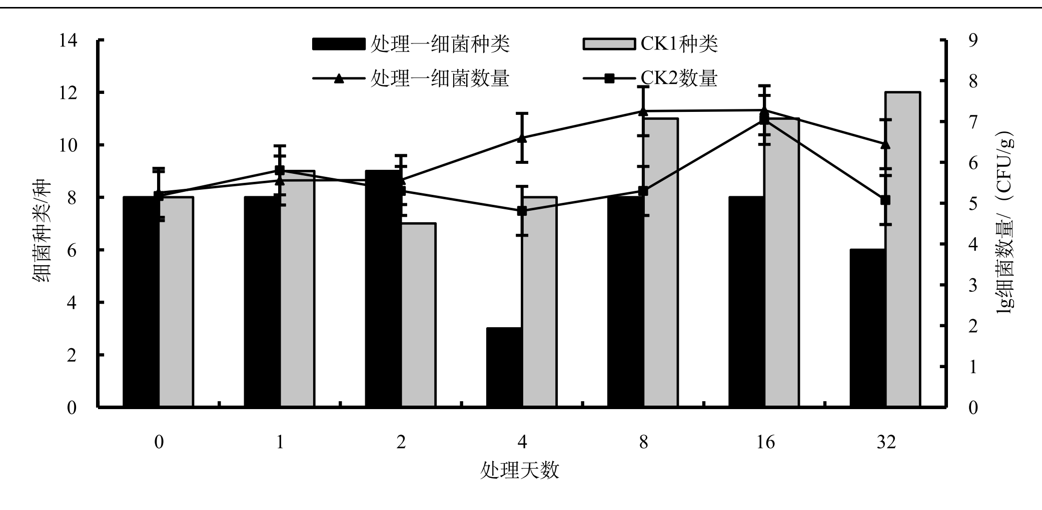


图 6-28 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理一土壤中细菌种类和数量的影响

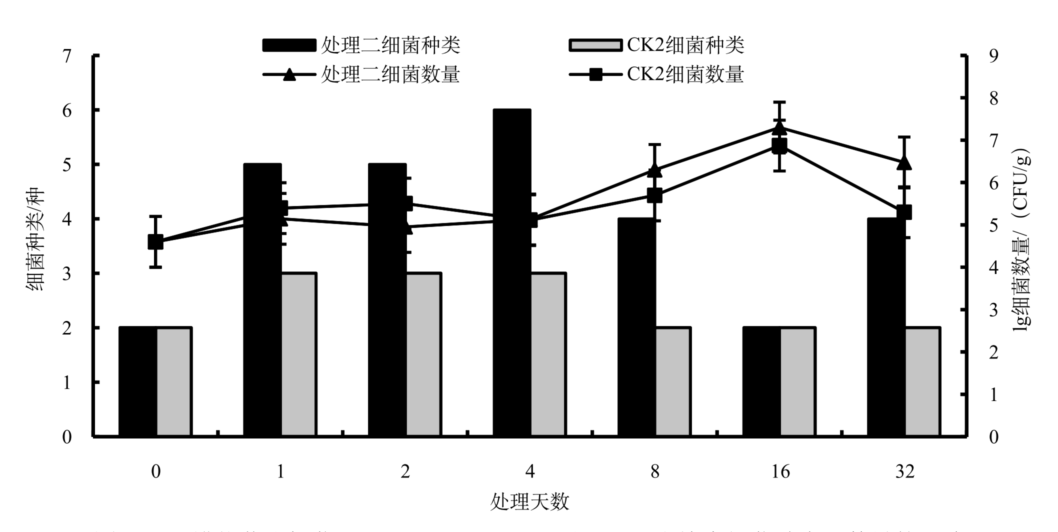


图 6-29 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理二土壤中细菌种类和数量的影响

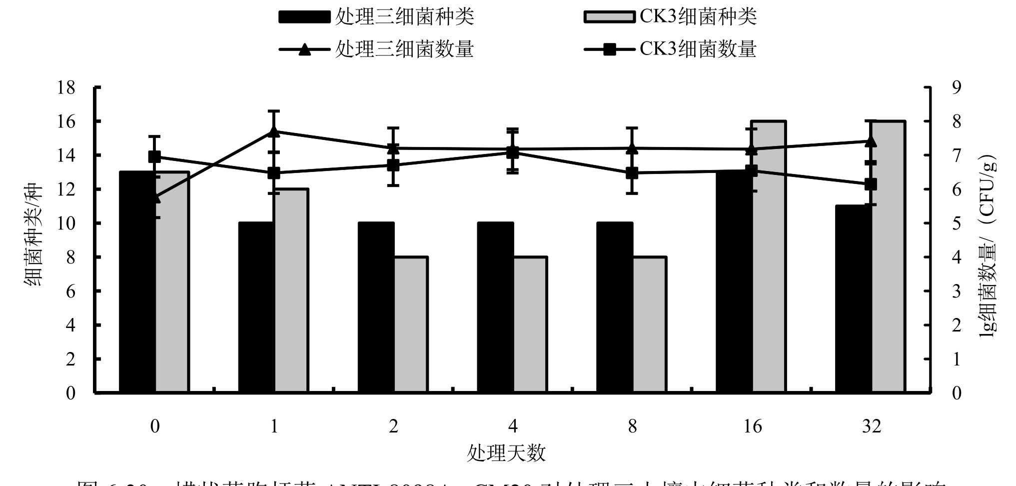


图 6-30 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理三土壤中细菌种类和数量的影响

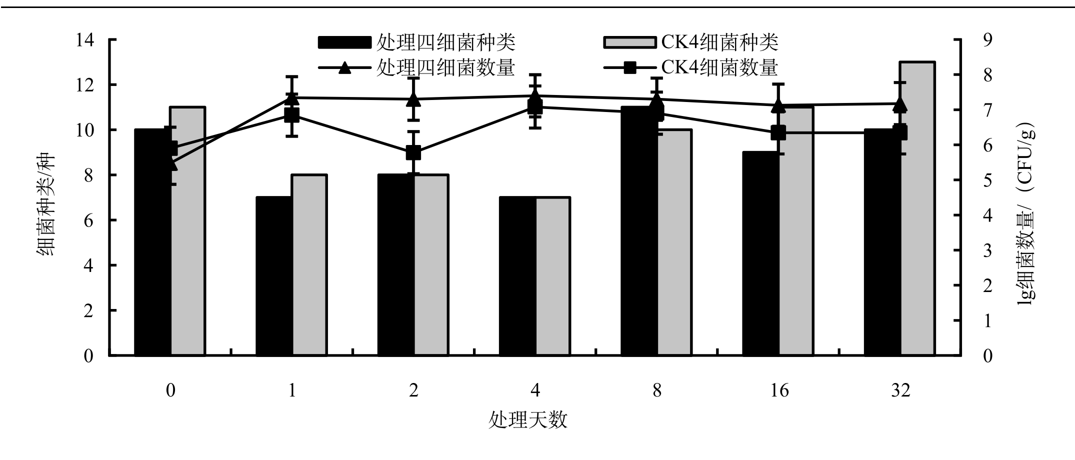


图 6-31　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理四土壤中细菌种类和数量的影响

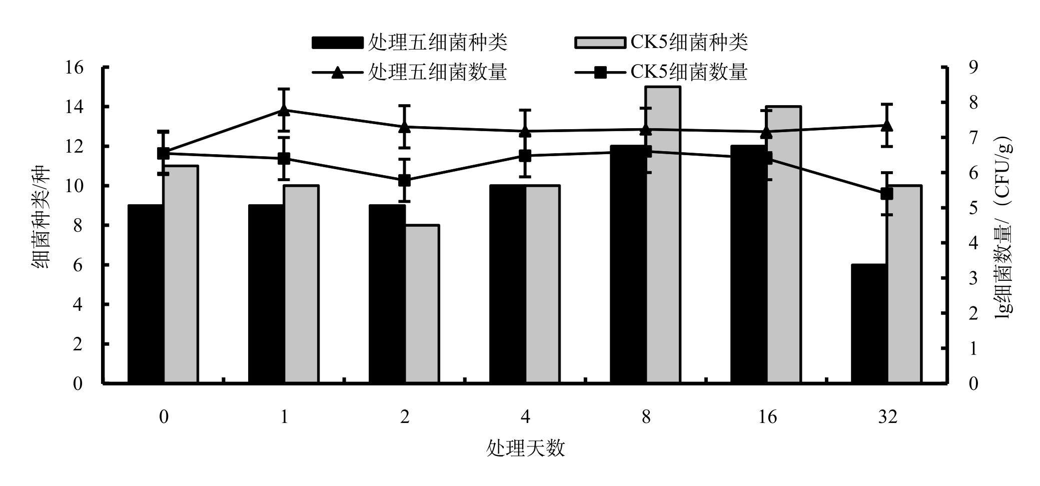


图 6-32　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理五土壤中细菌种类和数量的影响

处理四、处理五均在处理后第 1 天细菌含量就迅速增加，各处理中细菌数量迅速增加后又缓慢减少，逐渐保持在一定水平。用蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液处理 32d 后，处理一、处理三、处理四、处理五土壤中的细菌种类均有所减少，处理二土壤中细菌的种类明显高于处理前，就细菌数量而言，处理一、处理三、处理五略低于处理前，处理二、处理四与对照无明显差异。

六、芽胞杆菌对土壤中真菌种群的影响

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同性质土壤中真菌种类和数量的影响由图 6-33～图 6-37 可以看出，在用蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液处理后 32d，各处理土壤中处理组和对照组真菌数量均高于处理前，且处理组高于对照组。各处理组与对照组中真菌种类在处理前后略有波动，但变化不大。处理后 1d 真菌数量略增，处理后 8～32d，处理一、处理二中真菌数量骤增，处理三、处理四、处理五中真菌数量比第 4 天略有增加。

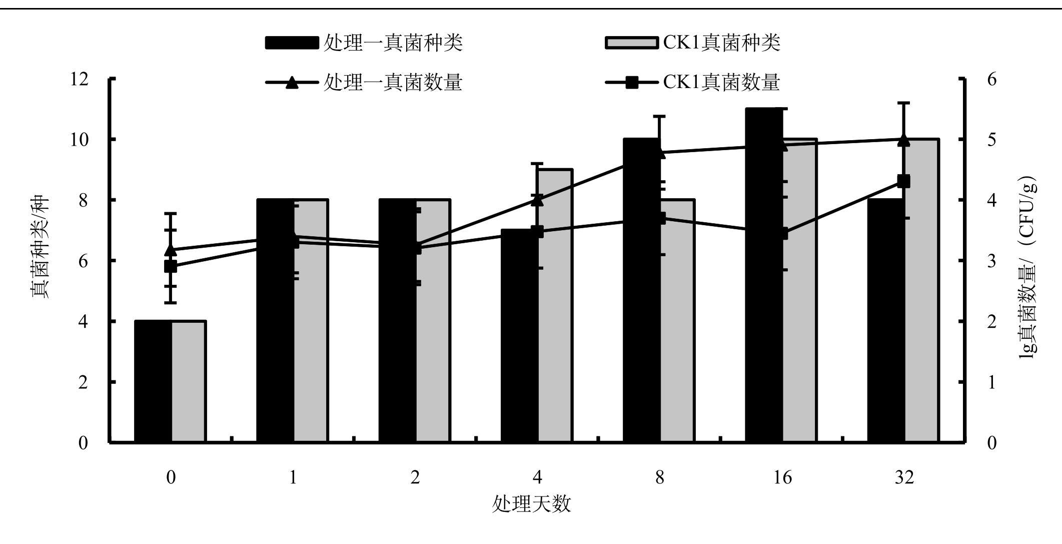


图 6-33　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理一土壤中真菌种类和数量的影响

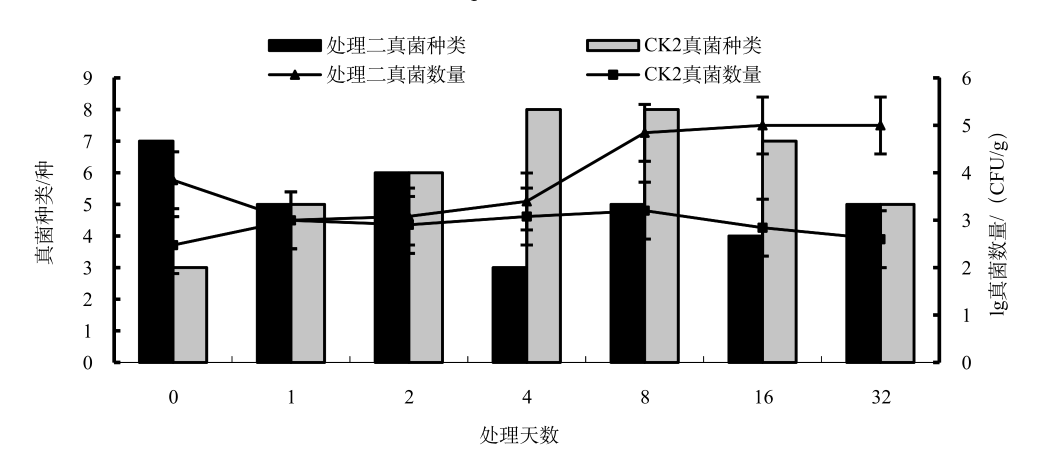


图 6-34　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理二土壤中真菌种类和数量的影响

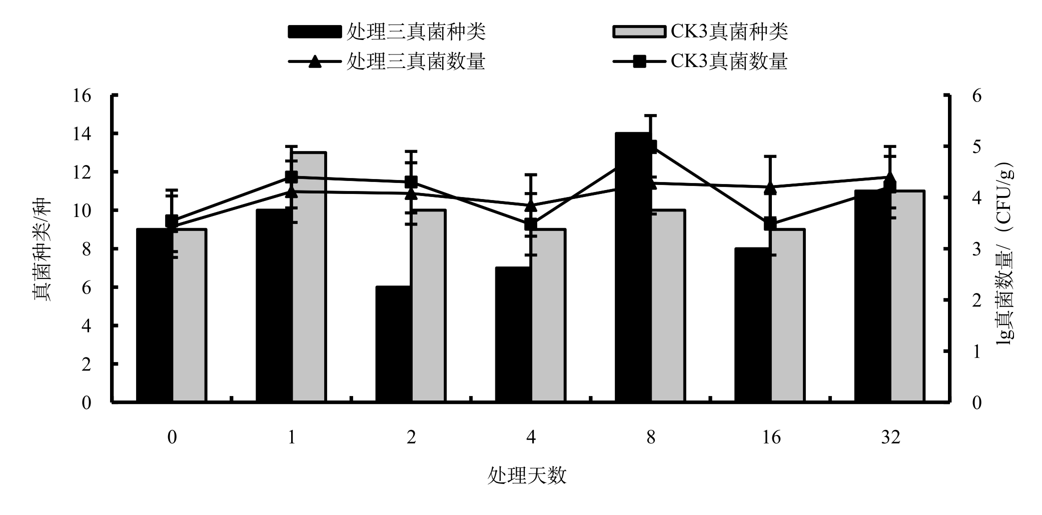


图 6-35　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理三土壤中真菌种类和数量的影响

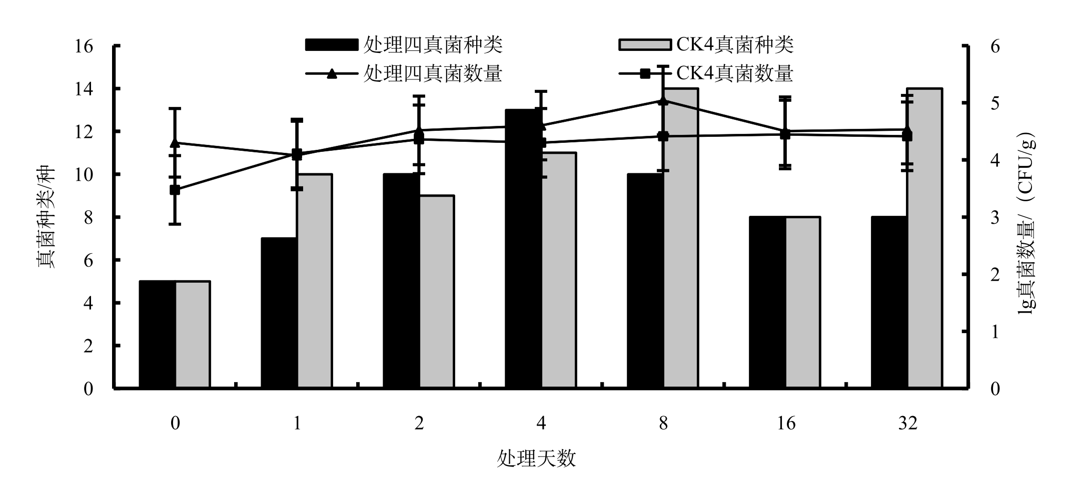


图 6-36　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理四土壤中真菌种类和数量的影响

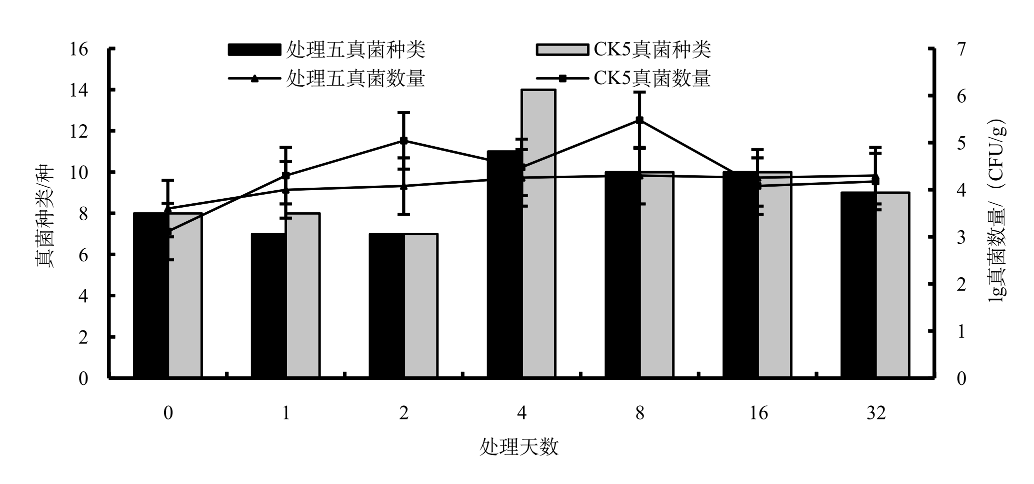


图 6-37　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:PCM20 对处理五土壤中真菌种类和数量的影响

七、芽胞杆菌对土壤中放线菌种群的影响

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同性质土壤中放线菌种类和数量的影响由图 6-38～图 6-42 可以看出，处理三、处理四、处理五土壤中放线菌种类较多，处理一、处理二土壤中较少，各处理的处理组和对照组中放线菌的动态变化都没有一定的规律性，就各处理而言，在用蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液处理后 32d，处理二土壤中放线菌种类较处理前有所下降，其他处理均略有上升；处理一、处理二的放线菌含量均高于各自的对照组，处理三、处理四、处理五中放线菌含量与对照无异。

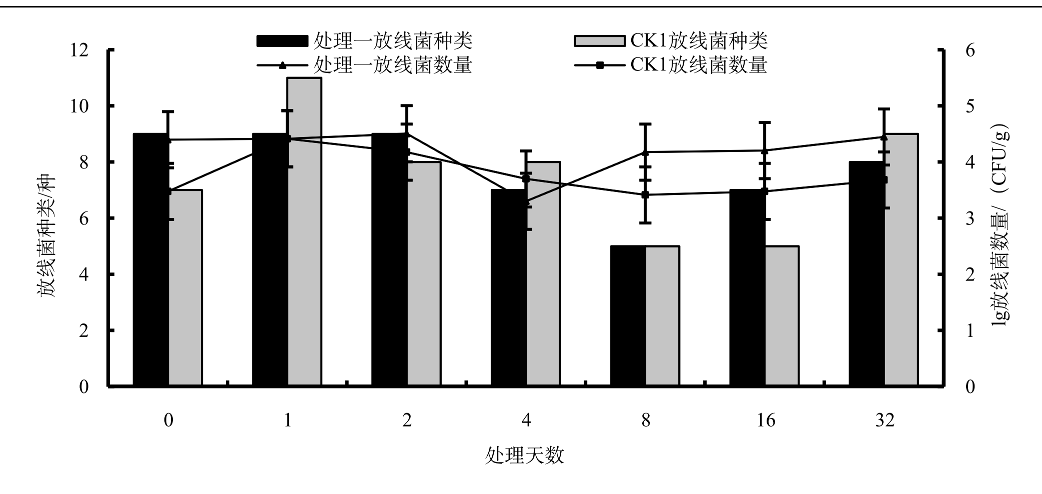


图 6-38　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理一土壤中放线菌种类和数量的影响

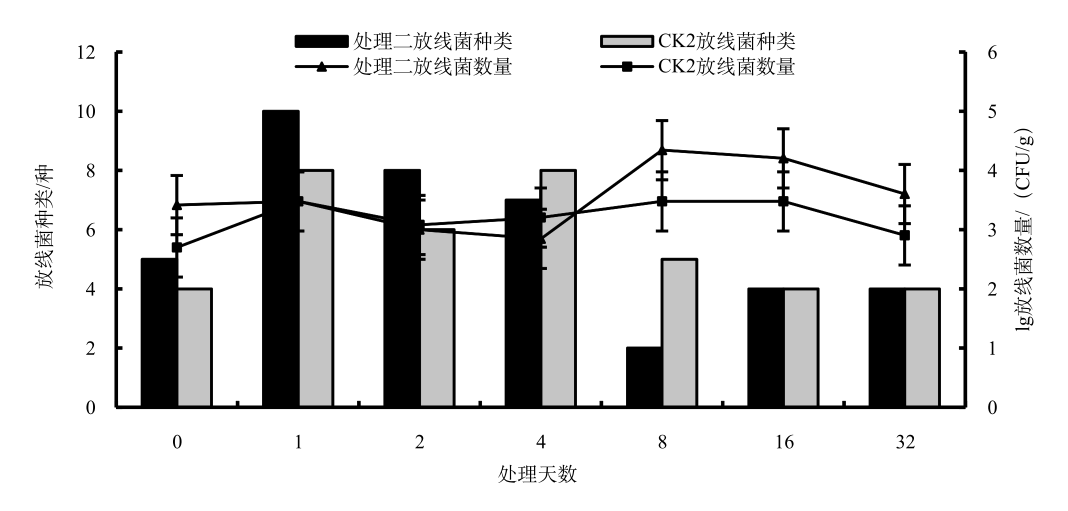


图 6-39　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理二土壤中放线菌种类和数量的影响

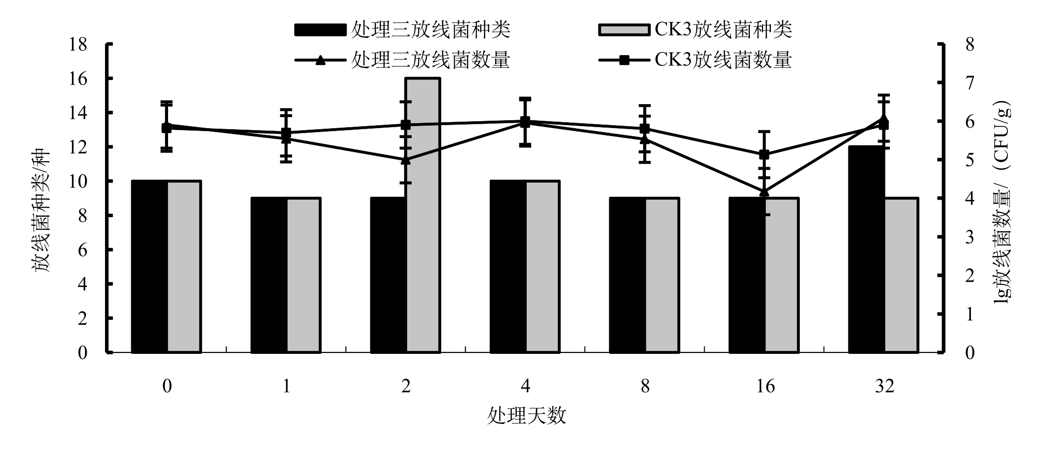


图 6-40　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理三土壤中放线菌种类和数量的影响

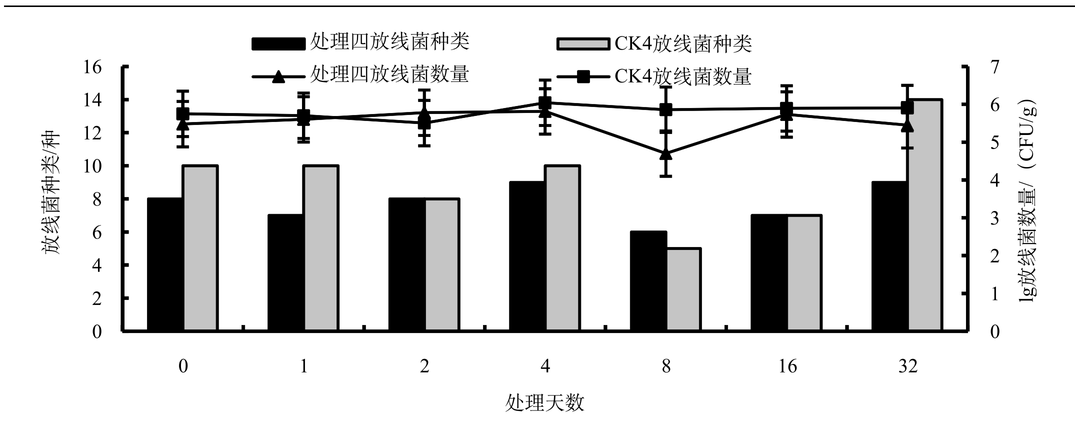


图 6-41　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理四土壤中放线菌种类和数量的影响

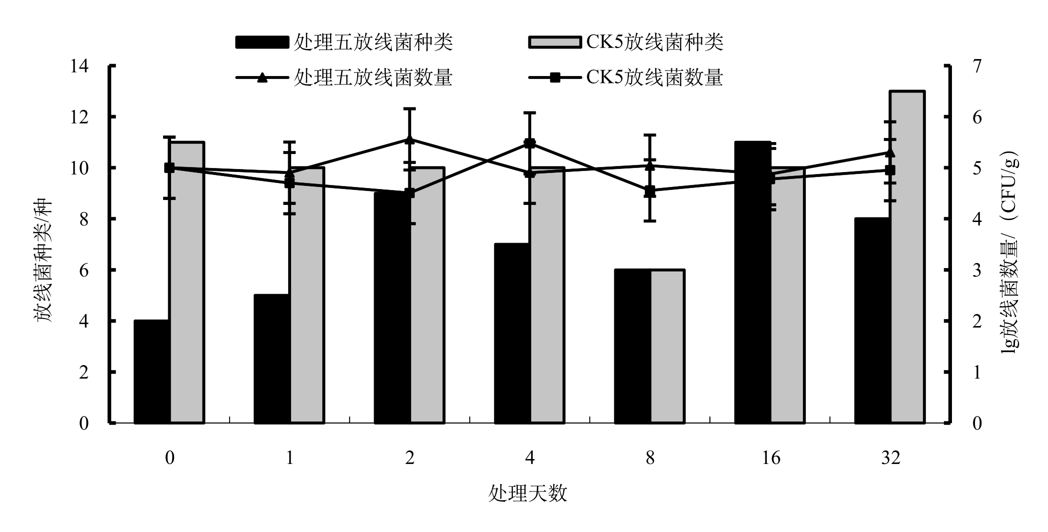


图 6-42　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对处理五土壤中放线菌种类和数量的影响

八、讨论

研究结果表明，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 可以在不同性质土壤中定殖，但定殖浓度差异较大，在未种植过作物的生土中定殖浓度较低，而在种植过茄子、花生、烟草的土壤中均可以很高的浓度定殖，最高甚至达 1×10^{6}CFU/g。追踪其定殖动态，第 160 天时回收的生防菌量仍保持较高的浓度，通过对回收菌株进行 *gfp* 基因检测，结果表明所测回收菌株均与初发菌株同源性一致。李术娜等（2009）报道棉花黄萎病拮抗细菌 2-70 在施入土壤中 25d 到 5 个月，该菌浓度在棉花根内保持 10^{3}CFU/g。张霞等（2005）报道了生防菌 P303 在施入土壤后随着时间的延长浓度逐渐下降，100d 之后检测不到该生防菌。与前人研究相比，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 在土壤中具有很强的定殖能力，具有广泛的适应性和较长时间的延续性。

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对不同处理土壤中微生物的影响不同，对同一处理土壤中细菌、真菌和放线菌的影响也不一致。与对照相比，各处理土壤中的细菌数量

均先迅速增加，之后又逐渐下降并保持在一定水平，均高于处理前。这可能是因为处理后蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 成为优势菌，各处理中细菌数量的统计通过平板计数进行，多数应为蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A: pCM20。随着时间的推移，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 与土壤中的微生物达到一种平衡状态，浓度逐渐趋于稳定。在用蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液处理后 32d，各处理土壤中处理组和对照组真菌数量均高于处理前，且处理组高于对照组。各处理组与对照组中真菌种类在处理前后略有波动，但变化不大。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对土壤中真菌没有明显影响，处理期间各处理土壤中真菌的变化可能由空气中或浇灌水中的真菌而引起。通过本实验看不出蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对土壤中放线菌的影响，不同土壤中的放线菌的变化也没有一定的规律。

第四节　芽胞杆菌生防菌在番茄根际的定殖

一、概述

芽胞杆菌生防菌的引入对植物根际微生态产生怎样的影响，是值得探讨的问题。环境微生物的生物多样性过去通常是用分离和培养技术加以研究的。近 20 年来，分子生态学技术迅速发展，通过对环境 16S rRNA 基因进行的大量研究表明，微生物生物多样性远比用传统方法估计的要高。微生物工作者惊奇地发现环境中绝大部分微生物实际上从没有得到过培养，这些未培养的微生物与已培养的种群在系统发育上存在很大差距。根际与其他生境一样，用分子生态学方法证明根际微生物不仅具有丰富的多样性，而且含有大量未培养的微生物种群。但是尽管在包括根际在内的不同生境中发现了大量未培养的微生物，人们对这些微生物在环境中的功能仍了解很少，大部分根际过程的微生物学机理尚不清楚。深入理解根际微生物生化过程和植物——微生物相互作用的机理仍然是根际微生物工作所面临的重大挑战。分子生态学方法已取得了一系列新的突破性进展，这些新方法使探索根际微生物不同个体的生态学功能成为可能。

根际存在着许多对植物有益的细菌群落，包括生防细菌、能产生植物生长激素的细菌和固氮菌等。在农业生态系统中，充分利用这些细菌的生物学潜力将有助于减少化肥和农药投入、促进植物生长、减轻环境污染、实现农业可持续发展。荧光假单胞菌（*Fluorescent pseudomonas*）的一些基因型是最常见的生防细菌，它们能产生抗生素氰化氢（hydrogen cyanide，HCN）和 2,4-二乙酰基藤黄酚（2,4-diacetylphloroglucinol，Ph1），对许多病原菌有抑制作用。在两种根腐病程度不同的土壤中，Ramette 等（2003）用分子手段分析了 HCN 合成基因的多态性，发现荧光假单胞菌有很多遗传突变型，土壤 Fe 的有效性可调节荧光假单胞菌的抗生素生产能力。Svercel 等（2009）从新老葡萄园（1951 年的和 1603 年的）和葡萄—烟草轮作土壤中分离荧光假单胞菌，并进行 HCN 和 Ph1 基因的多态分析，发现葡萄根际的 HCN 和 Ph1 基因型假单胞菌数高于烟草根际，老葡萄园土壤的 HCN 和 Ph1D 基因型高于新葡萄园土壤；轮作降低了 HCN 和 Ph1 基因型在总假单孢菌数的比例；根系分泌物似乎促进了一些生防细菌的发展。Bergsma-Vlami 等

（2005）也研究了植物种类（小麦、甜菜、马铃茹和百合）对内生假单胞菌生物多样性和抗生素生产的影响，发现除百合根系外，其他植物均支持了大量生防假单胞菌的生长；用 DGGE 对 *ph1D* 基因进行多态分析发现，500 个分离菌株可分成 7 个基因型；某些基因型有很高的植物专一性，但主要基因型没有植物专一性；小麦根际抗生素的生产能力比其他植物根际强。这些研究表明寄主植物种类对生防菌的成分、动态和活性有一定的调节作用。

二、研究方法

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理番茄植株 5d、10d、15d、20d、25d、30d 后取样，随机取 5 株苗，根际土中微生物的分离参照王慧敏等（2002）的方法，分别用 NA、PDA、高氏培养基分离土壤中的细菌、真菌、放线菌，重复 3 次。从番茄根际分离到的细菌 16S rDNA 鉴定 DNA 的提取采用水煮法，用接种环挑取两环菌体于 1.5ml 已灭菌离心管中，加入 1μl 1mol/L 的 NaOH 溶液，2.5μl 2%的 SDS 溶液，16.5μl 无菌双蒸水，95℃水浴 15min，再加入 180μl 无菌双蒸水，–20℃保存。通过因特网检索 GenBank（http://Blast.ncbi.nlm.nih.gov/），采用 Blast 软件进行序列同源性比较，确定所测菌株的分类位置。观察蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄根系生长处理后 30d 的影响，每个处理随机取 3 株番茄测量根系长度。

三、芽胞杆菌对番茄根际细菌的影响

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄根际细菌的影响由图 6-43 可以看出，处理后第 5 天处理组番茄根际可培养优势细菌种类和数量均少于对照组，其后处理组番茄根际细菌种类与对照组保持一致，细菌数量的变化趋势与对照组保持一致，总量略低于对照组。

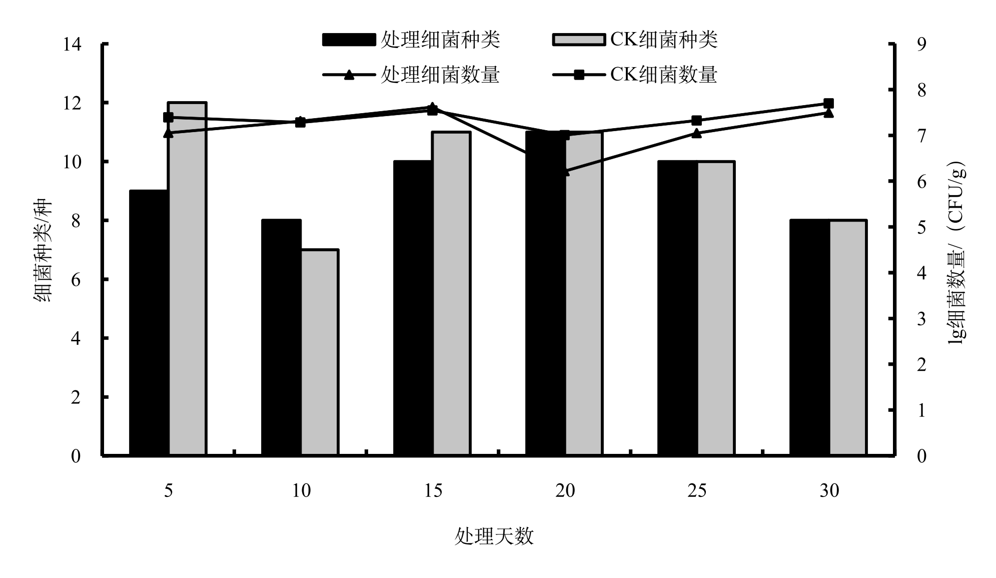


图 6-43　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄根际土壤中细菌的影响

对从番茄根际分离到的可培养优势细菌进行了16S rDNA鉴定，鉴定结果见表6-22，蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A处理组番茄根际可培养优势细菌的主要种类与对照组相同，有巨大芽胞杆菌、蜡质芽胞杆菌、木糖氧化无色杆菌、伯克霍尔德菌、中华根瘤菌、*Lysinibacillus* sp.、*Alpha proteobacterium* 及芽胞杆菌属的未知种名的细菌。处理组与对照组的优势细菌有几株不同见表6-22，处理组特有的优势细菌有嗜麦芽窄食单胞菌、争论贪噬菌、人苍白杆菌、节杆菌，对照组特有的优势细菌有窄食单胞菌、缺陷短波单胞菌、扩展短杆菌、肠杆菌。

表6-22　番茄根际细菌16S rDNA鉴定结果

处理组	CK
巨大芽胞杆菌	巨大芽胞杆菌
蜡质芽胞杆菌	蜡质芽胞杆菌
木糖氧化无色杆菌	木糖氧化无色杆菌
伯克霍尔德菌	伯克霍尔德菌
中华根瘤菌	中华根瘤菌
多粘类芽胞杆菌	多粘类芽胞杆菌
Alpha proteobacterium	*Alpha proteobacterium*
Bacillus sp.	*Bacillus* sp.
嗜麦芽窄食单胞菌	窄食单胞菌
争论贪噬菌	缺陷短波单胞菌
人苍白杆菌	扩展短杆菌
节杆菌	肠杆菌

四、芽胞杆菌对番茄根际真菌的影响

蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A对番茄根际真菌的影响见图6-44，处理期间，处理组与对照组番茄根际真菌种类和数量均有较大波动，到第30天，处理组番茄根际真菌种类明显少于对照组，真菌总量也略低于对照。

五、芽胞杆菌对番茄根际放线菌的影响

蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A对番茄根际放线菌的影响见图6-45，处理组与对照组番茄根际真菌种类和数量总体呈增长趋势，到第30天，处理组番茄根际放线菌种类少于对照组，放线菌总量也明显低于对照。

六、芽胞杆菌对番茄根系生长的影响

蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A对番茄根系生长的影响见图6-46，蜡状芽胞杆菌ANTI-8098A处理过的番茄植株根系比较稀疏细长，对照组根系比较浓密粗短，处理组根系最长的为38cm，对照组最长为28cm。

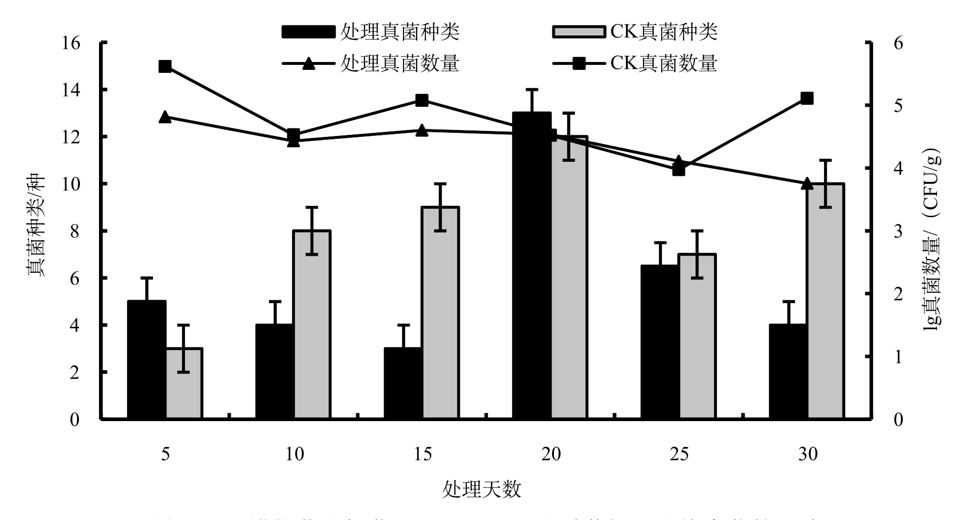


图 6-44　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄根际土壤真菌的影响

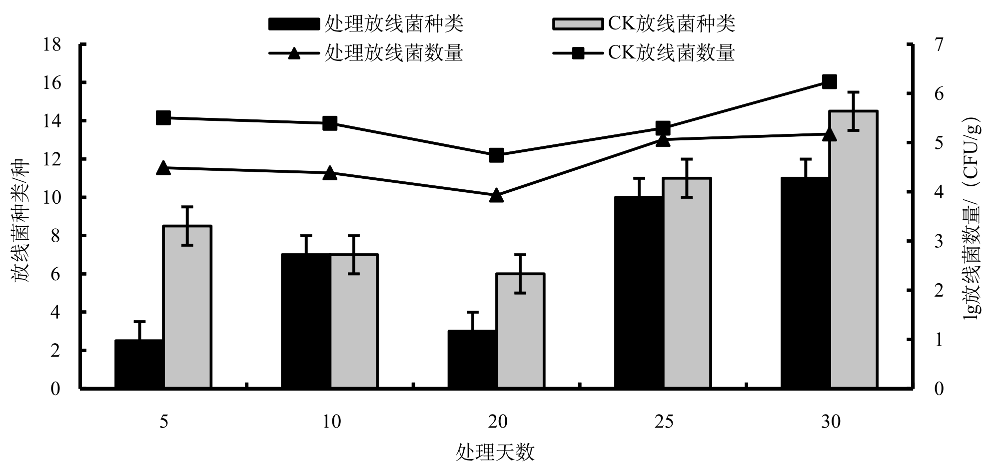


图 6-45　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄根际土壤放线菌的影响

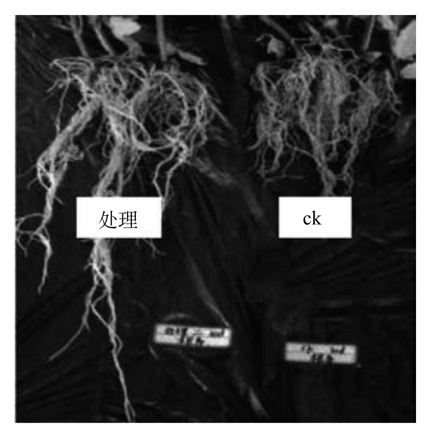


图 6-46　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄根系生长的影响

七、讨论

通过对番茄根际微生物的分离发现，番茄根际微生物在番茄生长过程中处于动态变化状态，与孙晓棠等（2008）报道的结果一致。李湘民等（2008）曾经报道，引入的拮抗细菌同土著细菌在营养和空间上竞争激烈，土著细菌更具有优势。接种蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 后，番茄根际细菌、真菌和放线菌总量略有减少，可能是因为蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 接菌浓度过高，影响了土壤中一些微生物的生长。张昕等（2007）曾报道过生防菌的引入对土著细菌会有短期生态效应，随着植株的生长，会逐渐趋向与对照相同。此外，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理后，番茄根系普遍比对照组长，从植物生理学角度来看，应该更利于番茄吸收土壤深层的水分和营养，从而有更好的生长状态和抗逆性。

Hurek 等（2002）提出测定环境微生物新陈代谢中的关键基因能提供微生物群体的功能信息。例如固氮基因特别适合于进行固氮微生物的系统发育分析。建立功能基因文库可揭示根际微生物的功能多样性。mRNA 实时定量分析则可预测功能基因的表达水平。Martin 等（2003）认为功能基因组学正在使生物机理研究有突飞猛进的进展。功能基因组学分析有机体的所有遗传物质，并将遗传信息与有机体的形态和功能联系起来。通过以基因组学为基础，在不同水平上分析转录组学、蛋白质组学和代谢组学，有可能使生物共生关系的机理研究取得突破性进展。但是基因组学在共生菌根菌、细菌—真菌—植物多级营养关系的研究上还面临着许多技术上的困难。将有机体之间的相互作用在分子层面上进行剖析，不仅需要对单个基因进行了解，还需要对多个基因的相互作用和表达进行研究。基因组学必须要面对这些相互作用的复杂性，面对根际微生物及其共生体随根际生物、物理、化学条件而发生适应变化的复杂性。DNA 芯片技术已在植物和基础微生物学研究方面得到广泛应用，但在根际微生物生态领域的应用尚属起步阶段。Sanguin 等（2006）用 16S rRNA 基因芯片技术观测玉米根际的细菌群体结构。他们设计了包含 200 个正核苷酸探针（片段长为 20bp）的 DNA 芯片，测试玉米根际和根外土壤的微生物群体，当以 19 个农杆菌序列为目标时，根际 DNA 的杂交水平明显高于根外土壤；但当用广谱性探针时，尽管有 12 个探针的杂交水平高于根外土壤，41 个探针的杂交水平却明显低于根外土壤。Shinano 等（2005）也报道了用于探测根际微生物群体的 DNA 芯片的研制工作，通过用人工细菌组合，发现一些细菌，如伯克霍尔德氏菌和芽胞杆菌，很容易被 DNA 芯片检测到，但另一些细菌如农杆菌、根瘤菌和亚硝化螺菌难以测到。这些研究表明用 DNA 芯片技术有可能对根际微生物群体结构和功能进行高通量分析，但是技术本身尚有许多有待完善的地方。

第五节　芽胞杆菌生防菌对番茄生理生化特性的影响

一、概述

植物本身就是一个复杂的生态系统，生防菌的引入会引起植物产生怎样的反应，产

生的影响对植物是有利的还是有害的，这都是在生防菌的使用之前有必要探究的问题。根际微生态是由植物—土壤—微生物组成的一个动态变化的生态系统，受到多种因素的影响。而生防菌能否很好地定殖于植物根际土壤，并且与植物及根际微生物达一个平衡状态，是生防菌能否很好防治土传病害要考虑的一个重要因子。植物叶绿素、可溶性蛋白含量和 SOD、POD、PPO 等酶系活性等生理生化指标常作为研究微生物与植物之间关系的衡量指标。研究方法如下。

二、研究方法

供试生防菌为青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A。供试番茄品种为‘瑞潘 007’。培养基包括 LB 培养基、NA 培养基、PDA 培养基和高氏培养基。高氏培养基：可溶性淀粉 20.0g、NaCl 0.5g、KNO_3 1.0g、$K_2HPO_3·3H_2O$ 0.5g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5g、$FeSO_4·7H_2O$ 0.01g、琼脂 17.0g，pH7.4～7.6。番茄根际细菌的 16S rDNA-PCR 扩增所用引物为细菌 16S rDNA 鉴定通用引物。

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄生理生化的影响：取 5～6 叶期番茄盆栽苗，将蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 原液稀释到 10^6CFU/ml，用 30ml 浓度为 10^6CFU/ml 的菌液进行灌根处理，对照用清水代替蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 菌液，各 40 株，处理后 5d、10d、15d、20d、25d、30d 取样，随机取 5 株苗，分别测定各项生理指标，最后一次取样测量番茄根系长度。叶绿素含量测定：采用 95%乙醇提取，紫外分析法测定，参照李合生等（2002）的方法。①取新鲜番茄植株绿色组织部分，擦净组织表面污物，剪碎（去掉中脉），混匀。②称取剪碎的新鲜样品 0.25g，每处理 3 份，分别放入研钵中，加入少量石英砂、碳酸钙粉及 2～3ml 95%乙醇，研成匀浆，再加入乙醇 10ml，继续研磨至组织变白，静置 3～5 分钟。③取滤纸一张，置漏斗中，用乙醇润湿，沿玻璃棒把提取液倒入漏斗中，过滤到 25ml 棕色容量瓶中，用少量乙醇冲洗研钵、研棒及残渣数次，最后连同残渣一起倒入漏斗中。④用吸管吸取乙醇，将叶绿体色素全部洗入容量瓶中，直至滤纸和残渣中无绿色为止。最后用乙醇定容至 25ml，摇匀。⑤把叶绿体色素提取液倒入光径 1cm 的比色杯内。以 95%乙醇为空白，分别在波长 665nm、649nm、470nm 下测定吸光度 A_{665}、A_{649}、A_{470}。按以下公式分别计算叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的浓度（mg/L）。公式（6-1）和公式（6-2）式相加即得叶绿素总浓度。

$$C_{\mathrm{a}} = 13.95A_{665} - 6.88A_{649} \tag{6-1}$$

$$C_{\mathrm{b}} = 24.96A_{946} - 7.32A_{665} \tag{6-2}$$

$$C_{\mathrm{x \cdot c}} = \frac{1000\,A_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b}{245}$$

求得色素的浓度后，再按公式（6-3）计算组织中单位鲜重的各色素的含量：

$$\text{叶绿体色素的含量（mg/ g）} = \frac{\text{色素的浓度} \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品鲜重}} \tag{6-3}$$

可溶性蛋白含量测定：采用紫外分析法，参照李合生等（2002）的方法。①样品的提取：称取鲜样 0.5g，用 5ml 0.05mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液研磨成匀浆后，3000r/min

离心 10min。②取适量上清液用 0.05mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液适当稀释后，用紫外分光光度计分别在 280nm 和 260nm 波长下读取吸光度，以 pH7.8 的磷酸缓冲液为空白调零。可溶性蛋白含量按照公式（6-4）和公式（6-5）计算：

$$蛋白质浓度(mg/ ml)=1.45A_{280}-0.74A_{260} \qquad (6\text{-}4)$$

$$蛋白质含量=\frac{(1.45A_{280}-0.74A_{260})\times n}{样品重}\times 100\% \qquad (6\text{-}5)$$

超氧化物歧化酶（SOD）活性测定：采用四唑氮蓝（NBT）光化还原法，参照李合生等（2002）、朱广廉等（1990）的方法。①酶液制备：取 1.0g 番茄组织，根、茎、叶分开，剪碎，置入预冷研钵中，加入适量 0.05mol/L pH6.0 磷酸缓冲液进行研磨提取。匀浆液 4℃离心 8500r/min，15min，上清液为酶粗提液，定容到 25ml 供测定。②SOD 反应体系见表 6-23。注意：100μmol/L EDTA-Na_2 避光保存；20μmol/L 核黄素（FD）要现用现配，避光保存。③SOD 的测定：取型号相同的 4 支试管，一支作为空白，一支作为对照（均不加酶液，以缓冲液代替）；空白置暗处，对照（CK）与酶液同置于 4000lx 条件下照光 20min，以空白调零，测定 560nm 波长下的吸光度。

表 6-23　SOD 反应体系

试剂	空白/暗处	对照/4000 lx	样品 1/4000 lx	样品 2/4000 lx
0.05mol/L 磷酸缓冲液	1.6	1.6	1.5	1.5
130mmol/L Met 溶液	0.3	0.3	0.3	0.3
750μmol/L NBT 溶液	0.3	0.3	0.3	0.3
100μmol/L EDTA-Na_2	0.3	0.3	0.3	0.3
20μmol/L 核黄素	0.3	0.3	0.3	0.3
酶液/mL	0	0	0.10	0.10
蒸馏水/mL	0.20	0.20	0.20	0.20
总体积/mL	3.0	3.0	3.0	3.0

已知 SOD 活性单位以抑制 NBT 光化还原 50%为一个酶活性单位表示，按公式（6-6）计算 SOD 活性：

$$SOD总活性（吸光度/gFW）=\frac{（A_{CK}-A_{E}）V_0}{0.5WA_{CK}V_1} \qquad (6\text{-}6)$$

式中，SOD 总活性（吸光度/gFW）以每克酶单位鲜重表示；A_{CK} 为照光对照管的吸光度；A_E 为样品管的吸光度；V_0 为样品总体积（ml）；V_1 为测定样品所用体积（ml）；W 为样品鲜重（g）。过氧化物酶（POD）活性测定：采用愈创木酚氧化法，参照李合生等（2002）的方法。①POD 反应液的配制：取 0.05mol/L pH6.0 磷酸缓冲液 50ml 于烧杯中，加入愈创木酚 28μl，磁力搅拌器加热搅拌使之完全溶解，冷却后加入 30% H_2O_2 19μl 混合，保存于冰箱中，备用。②POD 的测定：取 20μl 酶液和 2.8ml 反应液于比色皿中，20s 后在 470nm 下开始读数，1min 读数一次，共读 3 次，以 0.5mol/L pH6.0 磷酸缓冲液代替酶液作参比，活性按公式（6-7）计算：

$$\text{POD活性}\left[\text{U/}\left(\text{min}\cdot\text{gFW}\right)\right]=\frac{\Delta A_{470}V_0}{0.1\times V_1 Wt} \quad (6\text{-}7)$$

式中，ΔA_{470}为反应时间内吸光度的变化；W为样品鲜重（g）；t为反应时间（min）；V_0为提取酶液的总体积（ml）；V_1为测定时所用的体积（ml）。以每分钟 OD 值变化 0.1 为 1 个单位过氧化物酶活性[U/(min·g FW)]。多酚氧化酶（PPO）活性测定（贺忠群等，2008；梁军锋等，2005）：取 50ml 待测酶粗提液与 2.95ml 含 0.02mol 邻苯二酚的磷酸缓冲液（0.1mol/L，pH6.8）混合，30℃水浴 2min 后记录 398nm 处的 OD 值，以相同体积的提取缓冲液代替酶液为空白参照，活性按公式（6-8）计算：

$$\text{PPO活性}\left[\text{U/}\left(\text{min}\cdot\text{gFW}\right)\right]=\frac{\Delta A_{470}V_0}{0.01\times V_1 Wt} \quad (6\text{-}8)$$

式中，ΔA_{470}为反应时间内吸光度的变化；W为样品鲜重（g）；t为反应时间（min）；V_0为提取酶液的总体积（ml）；V_1为测定时所用的体积。以每分钟 OD 值变化 0.01 为一个多酚氧化酶活单位 U，用[U/(min·g FW)]表示酶活性。

三、芽胞杆菌对番茄叶绿体色素的影响

由图 6-47 可以看出，接种蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 后番茄苗叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量变化与对照组变化趋势一致，总体呈上升趋势。随着时间的推移，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄的叶绿素含量的影响效力减小。

由图 6-47A 可以看出，处理后第 5 天处理组番茄叶绿素 a 含量为 12.6mg/g，明显高于对照的 8.7mg/g，高出 3.9mg/g，第 30 天处理组番茄叶绿素 a 含量为 16.5mg/g，仅比对照的 15.6mg/g 高出 0.9mg/g，差异不明显。

由图 6-47B 可以看出，处理后第 5 天处理组番茄叶绿素 b 含量为 4.4mg/g，比对照的 3.1mg/g 高出 1.3mg/g，第 30 天处理组番茄叶绿素 a 含量为 5.7mg/g，与对照的 5.4mg/g 含量接近，仅高出 0.3mg/g。

由图 6-47C 可以看出，处理后第 5 天处理组番茄类胡萝卜素含量为 2.5mg/g，比对照的 1.8mg/g 高出 0.7mg/g，第 30 天处理组番茄类胡萝卜素含量为 3.3mg/g，仅比对照的 3.2mg/g 高出 0.1mg/g。

由图 6-47D 可以看出，接种后第 10 天处理组番茄叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值明显低于对照组，其后两者保持同一水平。

四、芽胞杆菌对番茄植株可溶性蛋白的影响

由图 6-48 可以看出，番茄叶片内可溶性蛋白含量明显高于茎部，为茎部的 3-4 倍。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理后第 5 天番茄叶片和茎部可溶性蛋白含量分别为 3.2mg/g 和 0.6mg/g，对照组第 5 天叶片与茎部可溶性蛋白含量分别为 2.7mg/g 和 0.6mg/g，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理后第 30 天番茄叶片和茎部可溶性蛋白含量分别为 6.0 和 1.1mg/g，对照组第 5 天叶片与茎部可溶性蛋白含量分别为 6.5mg/g 和 0.7mg/g。随着时间的推移，处理组和对照组番茄叶片与茎部内可溶性蛋白含量均呈缓慢上升趋势，两组间无明显差异。

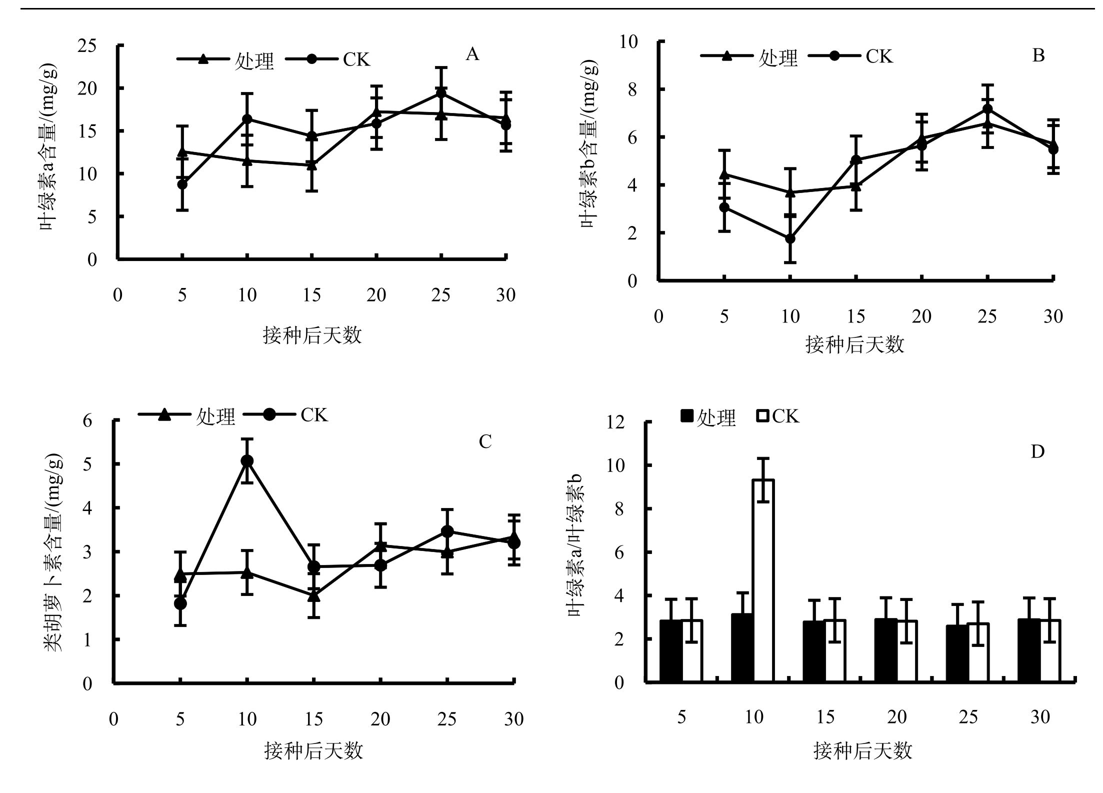


图 6-47　蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A 对番茄叶绿体色素的影响

A. 蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A 对番茄叶绿素 a 含量的影响；B. 蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A 对番茄叶绿素 b 含量的影响；C. 蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A 对番茄类胡萝卜素含量的影响；D. 蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A 对番茄叶绿素 a/叶绿素 b 的影响

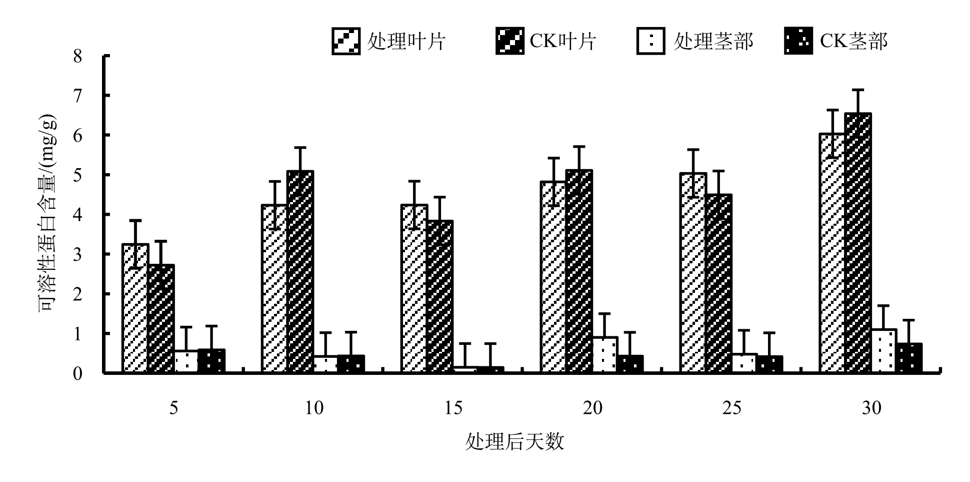


图 6-48　蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A:pCM20 番茄可溶性蛋白的影响

五、芽孢杆菌对番茄超氧化物歧化酶的影响

由图 6-49 可以看出，在蜡状芽孢杆菌 ANTI-8098A 试验处理期内，处理组与对照组番茄植株各部位 SOD 活性均比较稳定，没有大幅度的变化。叶片 SOD 活性最高，茎部

和根部相当。第 20 天，处理组叶片、茎部和根部 SOD 活性均下降且低于对照组对应部位的 SOD 活性；第 25 天，处理组各部位 SOD 活性与对照组处于同一水平。

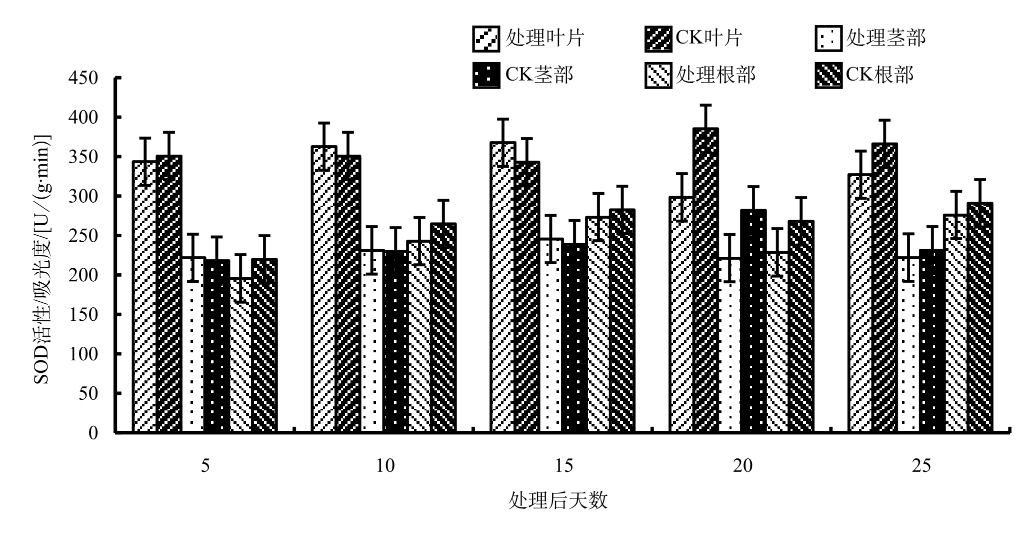


图 6-49　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄 SOD 活性的影响

六、芽胞杆菌对番茄过氧化物酶的影响

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄过氧化物酶的影响由图 6-50 可以看出，番茄根部 POD 活性较高，叶片次之，茎部 POD 活性很低，随着时间的推移，处理组与对照组叶片和根部 POD 活性均先上升后下降，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理后第 5～15 天处理组叶片活性低于对照组；第 20 天番茄各部位 POD 活性均高于对照组，其他时间无显著性差异。

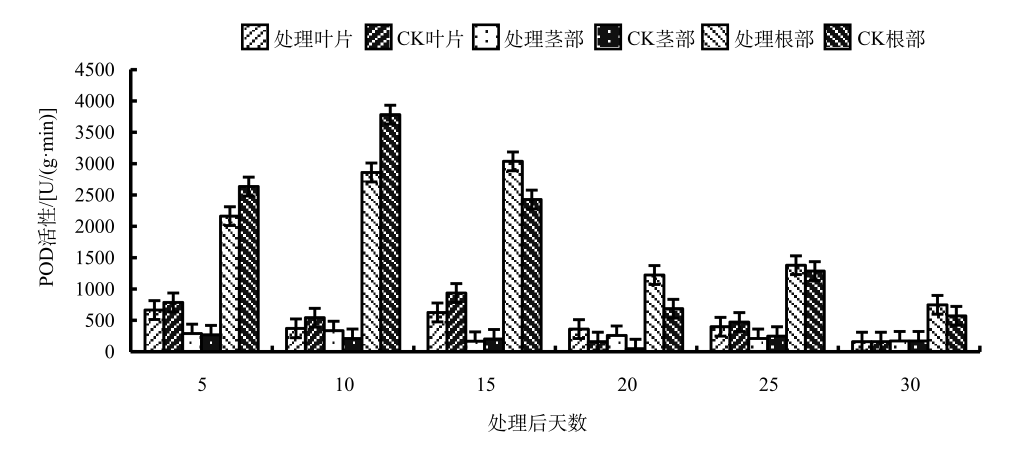


图 6-50　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄 POD 活性的影响

七、芽胞杆菌对番茄多酚氧化酶的影响

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄多酚氧化酶的影响由图 6-51 可以看出，番茄各部位 PPO 活性差异较大，其中根部活性最高，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理后番茄根部 PPO 活性不断升高，对照组番茄根部 PPO 活性呈现先上升后下降的趋势，处理组叶片和茎部 PPO 活性与对照组无明显差异，变化趋势保持一致。第 5 天处理组番茄根部 PPO 活性为 125U/（g·min），对照组为 238U/（g·min），到第 15～25 天时明显高于对照组活性，第 25 天处理组番茄根部 PPO 活性为 450U/（g·min），对照组为 205U/（g·min）。

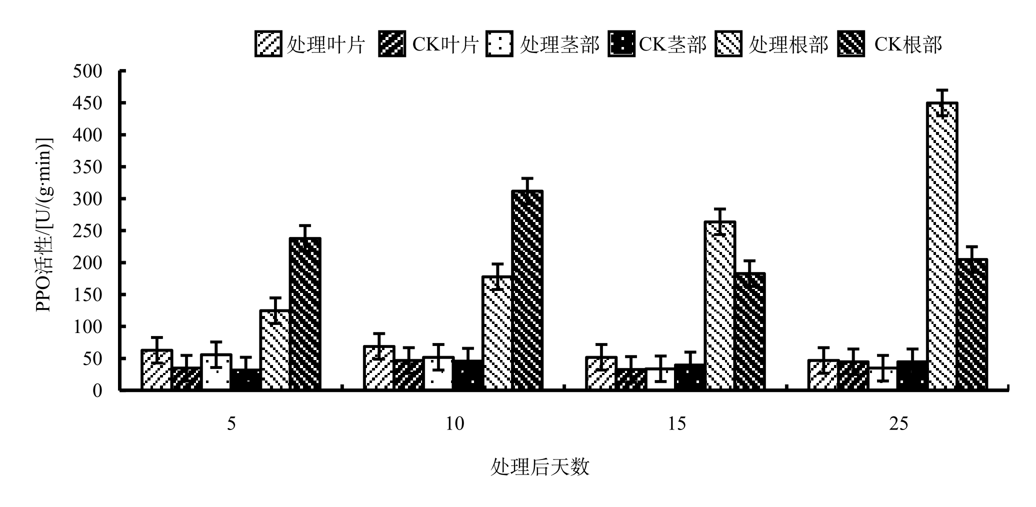


图 6-51　蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄 PPO 活性的影响

八、讨论

叶绿体色素是植物进行光合作用所必需的重要物质，在一定范围内，叶绿素含量越高，光合作用越强。蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理后第 5 天番茄叶绿素含量高于对照，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄植株叶绿素含量的影响有短期效应，随着番茄的生长，影响逐渐减小。第 10 天处理组叶绿素 a/叶绿素 b 值明显低于对照组，据伍泽堂和张刚元（1990）报道，叶绿素 a/叶绿素 b 值越大，膜脂过氧化作用越强，品种抗旱性越弱，说明蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 有可能提高番茄抗旱能力，促进番茄生长。田间条件下，植物受到细菌感染后可溶性蛋白含量会下降，龚一富和高峰（2008）研究结果表明，根癌农杆菌的感染会导致甘薯外植体内可溶性蛋白含量下降，而高含量可溶性蛋白可以提高植物抗旱性。本节的研究结果表明，接种蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 后，番茄叶片和茎部的可溶性蛋白含量不断增加，与对照组变化趋势一致，可能是番茄苗期生理的一个正常变化。关于植物抗病性相关酶系的研究报道有很多。梁志怀等（2008）研究表明，哈茨木霉在水稻秧苗内的定殖会使得 POD、PPO 活性高，但 SOD 和 POD 活性与植物抗病性有无明显相关性尚无统一论断。许英俊等（2008）报道了 3 株生防放线菌可以提高草莓根系 PPO 活性，对增强抵抗草莓根系根区病原菌侵染有一定效果。本实验结果表明，

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对番茄 SOD 和 POD 活性的影响并不明显，但是接种蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 后，番茄根系 PPO 活性明显提高，这一结果对于防治土传病害番茄青枯病意义重大。

第六节　芽胞杆菌生防菌对香蕉苗生理生化特性的影响

一、概述

植物根际促生菌（plant growth promoting *Rhizobacteria*，PGPR）泛指生存于植物根围环境、能促进植物生长的一类有益细菌（Kloepper *et al.*，1978）。传统上，PGPR 的研究及应用范围大都局限于其对植物的促生作用及其对土传病害的拮抗性防治。PGPR 对于土传病害的生防机制主要有：①PGPR 与目标病原菌在空间与营养上的竞争；②产生对病原菌具拮抗作用的代谢产物，如铁载体、氰化氢、抗生素及胞外酶。令人感兴趣的是，近年来不断有研究表明，许多 PGPR 菌株还能诱导植物产生系统抗病性。这一新型的防病机制类似于人类的“种痘”免疫作用，具有很大的优越性，被认为是生物防治策略的一个重大进步（吴跃开，2006）。因而，在这一领域的研究越来越受到微生物应用学家及植物病理学家的重视。而植物对病害及其他逆境的抗性与多种酶的活性及某些物质含量的变化有关，如苯丙氨酸解氨酶（PAL）、过氧化物酶（POD）、超氧化物歧化酶（SOD）、多酚氧化酶（PPO）、过氧化氢酶（CAT）、肉桂醇脱氢酶（CAD）、脂氧合酶（LOX）、1,3-葡聚糖酶、几丁质酶及丙二醛（MDA）等（黄世文等，2008）。芽胞杆菌类细菌还能够诱导寄主产生抗性，抵抗植物病菌的侵染（Guetsky *et al.*，2002）。

生防菌 JK-2 对香蕉枯萎病具有明显的防治作用，转绿色荧光蛋白后对其抑菌活性没有影响。但它对香蕉是否具有侵染和诱导抗性作用，目前尚不清楚。在本节中，作者采用 GFP-JK-2 对香蕉组培苗侵染特性及接种后对香蕉组培苗的过氧化物酶（POD）、超氧化物歧化酶（SOD）、多酚氧化酶（PPO）的活性及丙二醛（MDA）的含量变化进行了研究，并探讨生防菌的作用机制，希望能够为生防菌诱导抗性提供科学依据。研究方法如下。

二、研究方法

1）实验材料。GFP-JK-2 菌株，香蕉组培苗，LB 培养基，红霉素（Erythromycin）。

2）发酵液的制备。FP-JK-2 菌株在 LB 培养基（含 10μg/ml 红霉素）30℃培养 24h，接到 LB 液体培养液（含 10μg/ml 红霉素）中 30℃、170r/min 培养 48h。

3）细菌计数及接种。将上述菌液计数为 1×10^8CFU/ml，采用伤根法进行接种，100μl/瓶。在 30℃，12h 黑暗 12h 光照培养。

4）GFP-JK-2 的分离。将样品冲洗干净，用滤纸吸干表面水分，称取样品 1g，先用 75%乙醇浸泡数秒，无菌水冲洗数次后，然后用 10%次氯酸钠浸泡 5min，无菌水冲洗数次后用无菌滤纸吸干表面水分；再用无菌剪刀剪碎样品于无菌研钵中，充分研磨匀浆，稀释在 9ml 无菌水中；最后按 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 梯度稀释样品，各取 200μl 稀释液

涂布于 LB 平板（含 10μg/ml 红霉素）上，处理后的平板倒置于 30℃暗培养箱 2d，进行统计。

5）酶液的提取及活性测定方法，测定酶活样品取样，在接种后的 0d、1d、2d、4d、6d、8d、12d、16d、24d、30d 分别取根、茎、叶 1.0g 储存于−80℃用于活性测定。将 1.0g 根部、茎部和叶片，分别加入 10ml 0.05mol/L pH7.8 磷酸缓冲液研磨后于 3000*g* 离心 10min，上清液转入 25ml 容量瓶中。沉淀用 5ml 磷酸缓冲液再提取 2 次，上清液并入 25ml 容量瓶中，定容至刻度，4℃条件下保存备用。PPO 酶、POD 酶和 SOD 酶活性测定方法参照第六章第五节。

三、芽胞杆菌生防菌对香蕉苗的侵染作用

实验结果表明（表 6-24），芽胞杆菌 GFP-JK-2 对香蕉组培苗没有侵染。因为实验室分离的 GFP-JK-2 是从土壤中分离出来的，这说明它本身不是植物的内生菌，另外，香蕉组培苗的培养基的营养条件相对较丰富，这也可能是其没有侵染的原因。

表 6-24　短短芽胞杆菌 GFP-JK-2 对香蕉苗侵染的分离结果

侵染部位	分离菌落数/个							
	1d	2d	4d	6d	8d	12d	16d	30d
根	0	0	0	0	0	0	0	0
茎	0	0	0	0	0	0	0	0
叶	0	0	0	0	0	0	0	0

四、芽胞杆菌生防菌对香蕉苗多酚氧化酶（PPO）活性的影响

实验结果见图 6-52～图 6-54。由图 6-52 可知，经芽胞杆菌生防菌 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗根部的 PPO 活性与 CK 根部的 PPO 活性变化比较明显，前者酶活性较后者大，第 4 天时，CK 根部的 PPO 酶活性达最大值 14.625U/（g·min）。而经过处理的香蕉组培苗在第 6 天时达最大值为 19.875U/（g·min），是 CK 最大值的 1.40 倍；由图 6-53 可知，经菌株 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗茎部的 PPO 活性也基本大于 CK 茎部的 PPO 活性，第 4 天时，CK 茎部的 PPO 酶活性达最大值 19.625U/（g·min）。而经过处理的香蕉组培苗茎部的 PPO 活性在第 16 天时达最大值为 34.75U/（g·min），是 CK 最大值的 1.77 倍；由图 6-54 可知，经菌株 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗叶片的 PPO 活性与 CK 叶片的 PPO 活性两者相互间变化不大，但是经过处理的香蕉组培苗叶片中 PPO 活性的变化波动较小。而且在 1～8d，CK 的 PPO 活性高于处理的 PPO 活性，在 8～30d，前者的酶活性小于后者的酶活性。以上说明接种 GFP-JK-2 可以提高香蕉组培苗植株各部分 PPO 的活性，有利于提高植物的抗性。

五、芽胞杆菌生防菌对香蕉苗过氧化物酶（POD）活性的影响

实验结果见图6-56和图6-57，经过芽胞杆菌生防菌GFP-JK-2处理的香蕉组培苗的

POD活性无论是根部还是茎部均明显高于CK；CK根部的POD活性最高在第1天为5.83U/（g·min），而经过GFP-JK-2处理的香蕉组培苗根部的POD活性最高在第4天，高达16.58U/（g·min），为CK的2.84倍；CK茎部的POD活性最大值也在第1天，为1.08U/（g·min），而经GFP-JK-2处理过的香蕉组培苗颈部的POD活性最大在第8天，为1.92U/（g·min），为CK的1.78倍。以上说明经过GFP-JK-2处理后，香蕉组培苗的POD活性明显提高，有利于提高植株抗病性。

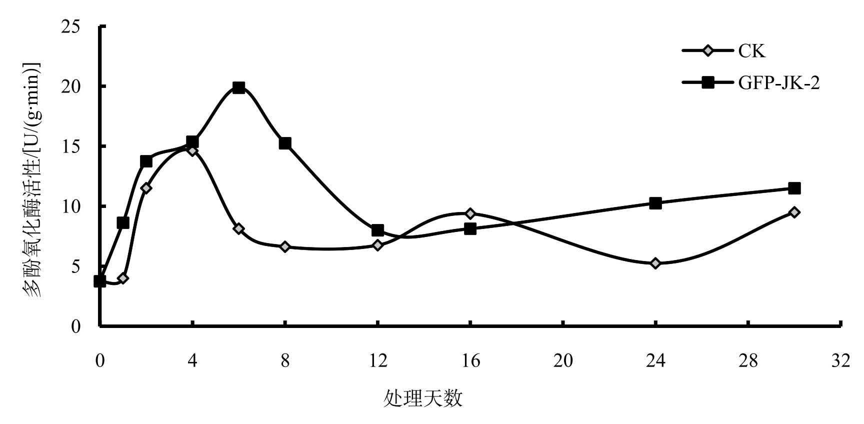


图 6-52　不同处理香蕉组培苗根部多酚氧化酶活性的变化

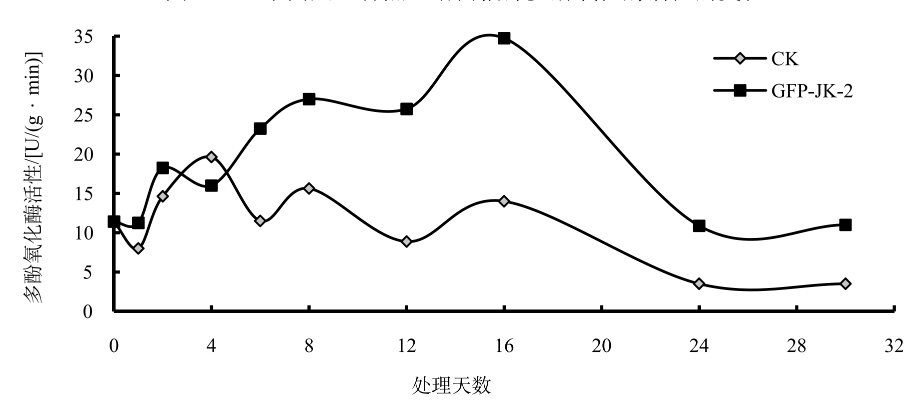


图 6-53　不同处理香蕉组培苗茎部多酚氧化酶活性的变化

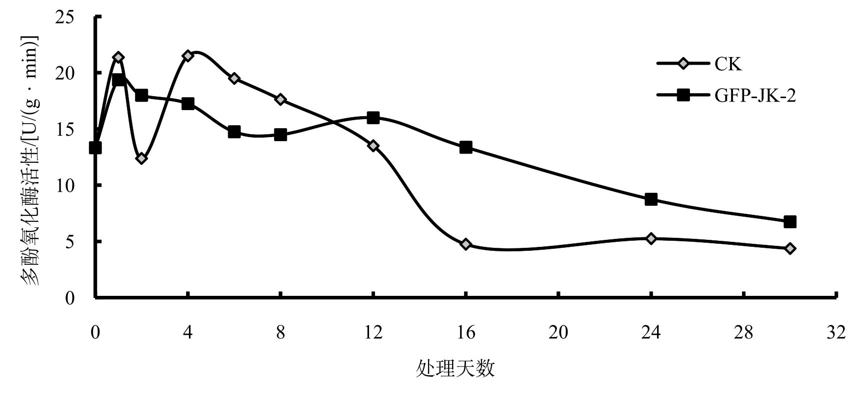


图 6-54　不同处理香蕉组培苗叶片多酚氧化酶活性的变化

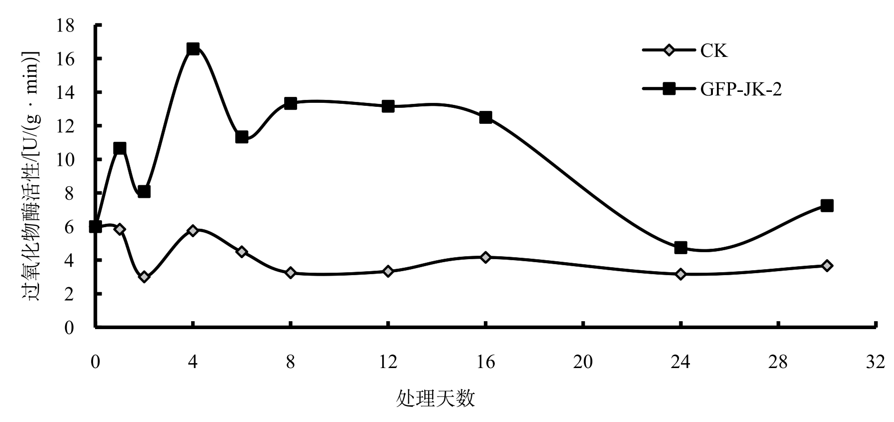


图 6-55　不同处理香蕉组培苗根部过氧化物酶活性的变化

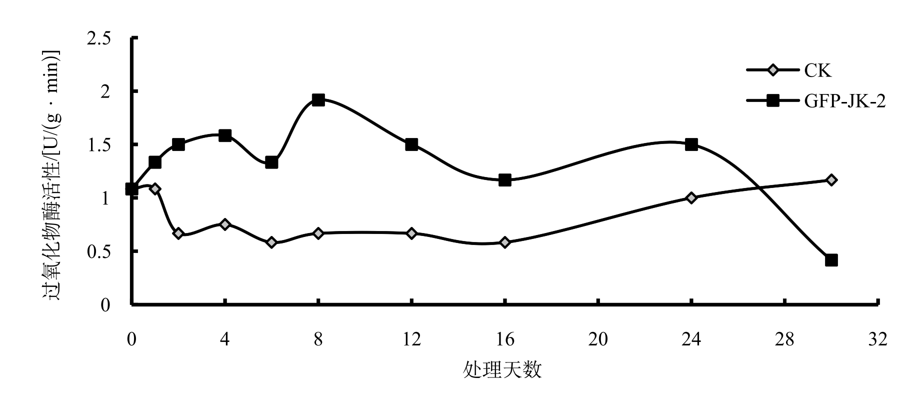


图 6-56　不同处理香蕉组培苗茎部过氧化物酶活性的变化

六、芽胞杆菌生防菌对香蕉苗超氧化物歧化酶（SOD）活性的影响

实验结果见图 6-58～图 6-60，经 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗根部的 SOD 活性与 CK 根部的 SOD 活性变化不大，其变化的趋势基本一致，在 1～8d 其酶活性波动较大而在 12～30d 波动较平缓；茎部和叶片的 SOD 活性有低于 CK 的趋势，但在 24～30d，CK 的 SOD 活性呈下降趋势而 GFP-JK-2 处理的 SOD 活性呈上升趋势。

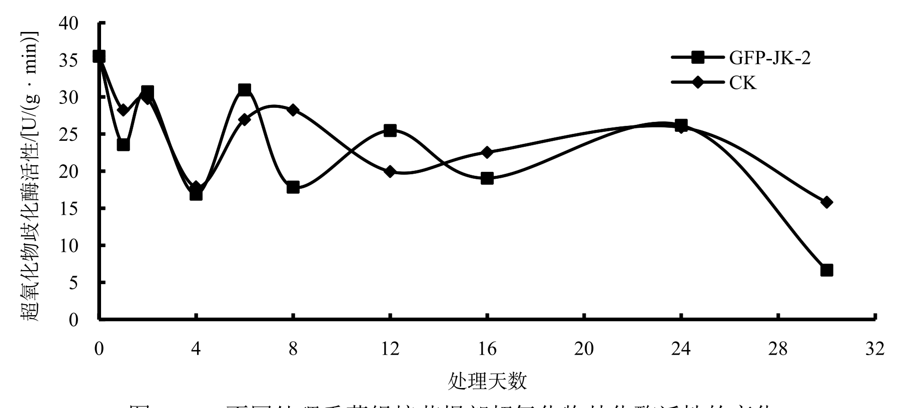


图 6-57　不同处理香蕉组培苗根部超氧化物歧化酶活性的变化

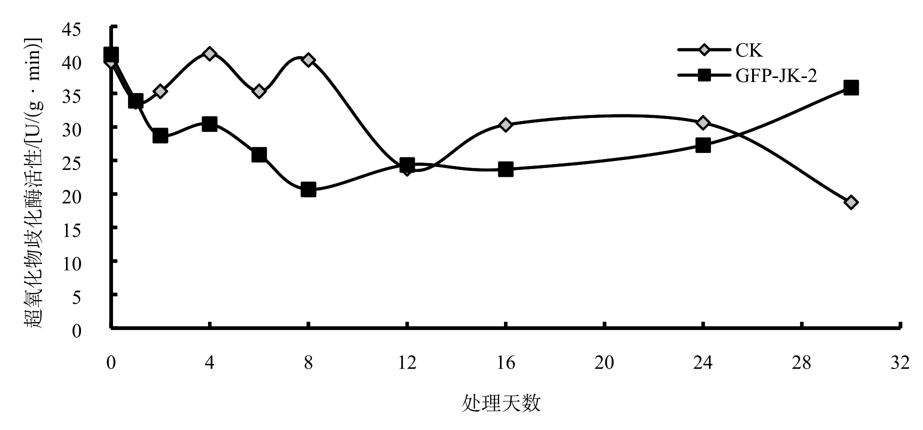


图 6-58　不同处理香蕉组培苗茎部超氧化物歧化酶活性的变化

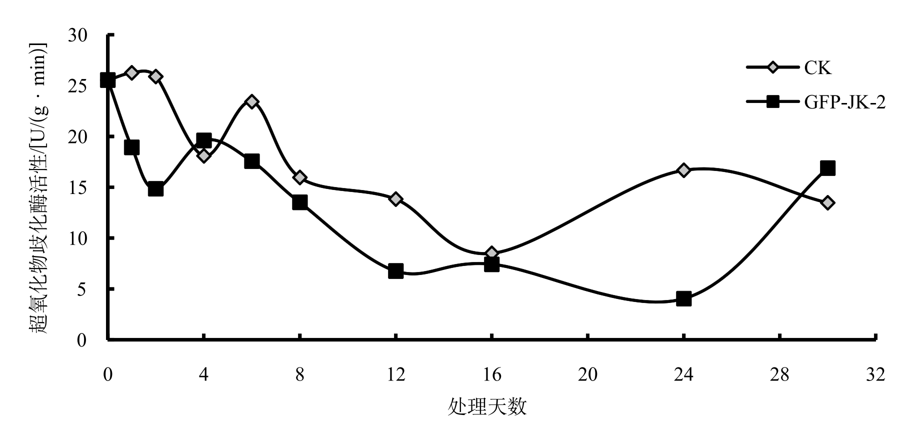


图 6-59　不同处理香蕉组培苗叶片超氧化物歧化酶活性的变化

七、芽胞杆菌生防菌对香蕉苗丙二醛（MDA）含量的影响

实验结果见图 6-60～图 6-62，经过 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗的 MDA 含量不管是根部还是茎部和叶片均高于 CK，这说明接种 GFP-JK-2 提高了 MDA 的含量；经过处

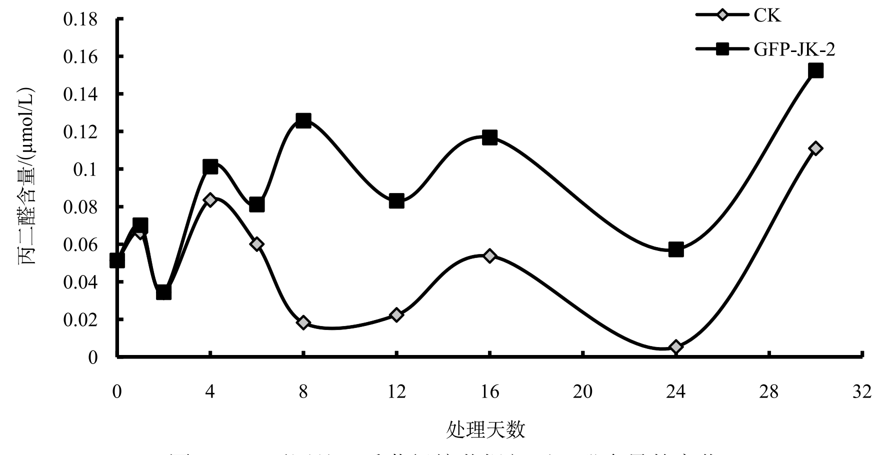


图 6-60　不同处理香蕉组培苗根部丙二醛含量的变化

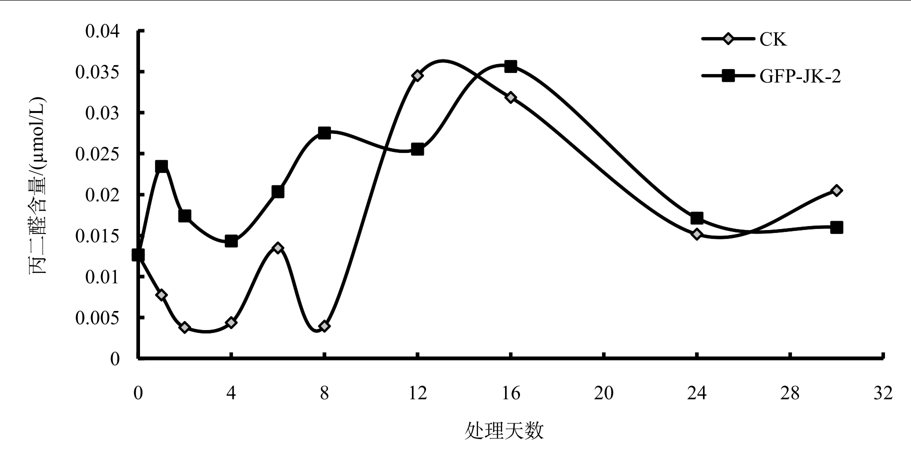


图 6-61　不同处理香蕉组培苗茎部丙二醛含量的变化

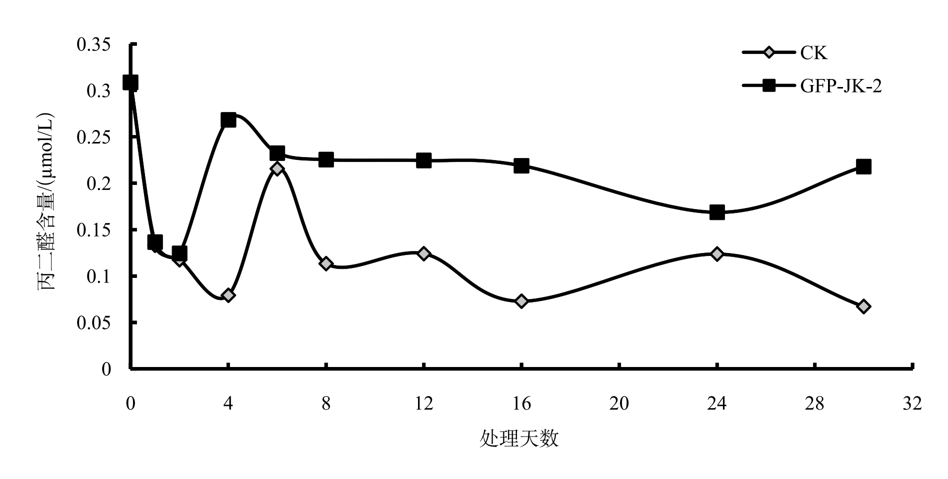


图 6-62　不同处理香蕉组培苗叶片丙二醛含量的变化

理的香蕉组培苗根部 MDA 的含量第 1 天和第 2 天与对照基本没有差别。在第 4 天之后处理的 MDA 含量一直高于 CK，且波动的幅度小于 CK，这说明接种 GFP-JK-2 稳定地提高了香蕉组培苗根部的 MDA 含量；接种 GFP-JK-2 的香蕉组培苗茎部的 MDA 含量在 16d 达最大值 0.036μmol/L，而 CK 的在 12d 达最大值 0.035μmol/L。这说明接种 GFP-JK-2 延长了茎部 MDA 持续增长的时间；而对于香蕉组培苗叶片的 MDA 含量，接种 GFP-JK-2 的香蕉组培苗在第 4 天达最大值，为 0.268μmol/L，CK 的在第 6 天达最大值，为 0.215μmol/L；另外，通过对根茎叶数据分析发现 MDA 的含量为叶片＞根部＞茎部。这说明 GFP-JK-2 对 MDA 有较大影响。

八、讨论

实验对菌株 GFP-JK-2 对香蕉组培苗的侵染特性及接种后对植物抗病相关酶活的影响进行了研究。侵染结果显示在 30℃，12h 黑暗 12h 光照培养条件下，GFP-JK-2 不能侵染香蕉组培苗。因为 JK-2 是本实验室从土壤中分离出来的，这说明它本身不是植物的内生菌；另外，香蕉组培苗的培养基的营养条件相对较丰富，这也可能是其没有侵染的

原因。

当植物处于逆境（如微生物、低温、干旱等）时，植物体内活性氧自由基水平提高、丙二醛（MDA）及过氧化氢（H_2O_2）含量增加，植物体内存在适量的SOD、PPO、POD和MDA等保护酶系统，SOD专一性地清除活性氧自由基而防止发生膜脂质过氧化，POD主要分解H_2O_2，其氧化活性能够使蛋白质交联，苯丙自由基能加强寄主的细胞壁，保护细胞膜结构，从而抵御真菌病害的侵入（Kristensen *et al.*，1999；Huckelhoven *et al.*，1999）。PPO能使酚类物质氧化成对病原菌毒性更强的醌类物质。同时适当的逆境能提高植物体内保护酶系统的功能。因此，这些酶在抗病反应过程中起着重要的作用。

实验结果表明：在接种GFP-JK-2条件下，香蕉组培苗MDA含量增加，POD、PPO的活性基本升高，而对SOD活性变化的影响不一致，对香蕉组培苗根部的SOD活性影响不明显，但使茎部和叶片中的SOD活性稍有降低。接种GFP-JK-2后，香蕉组培苗的POD活性1d后则明显升高，在一个月内基本稳定高于对照的POD活性。香蕉组培苗根茎的PPO活性明显提高，该结果说明，香蕉组培苗采用伤根法接种GFP-JK-2后能明显提高香蕉组培苗根茎的POD活性，有利于提高植株的抗病能力。但是其也使植株MDA的含量增高，不利于植株的抗病。根际细菌的诱导抗性作用在接种量超过某一阈值后，不随接种量的增多而增强，且诱发的抗病性具有较好的持续性，不随定殖群体数的减少而迅速下降（van Loon *et al.*，1998），所以接种后其利弊有待于进一步探讨，接种的浓度也有待于进一步优化。

第七节　芽胞杆菌和枯萎病原对香蕉苗酶系诱导作用

一、概述

早在20世纪30年代，就有学者发现植物体能被一些生物或非生物的刺激原（诱导物）诱导产生一种对多种病害的抵抗力，并将这一现象称为“获得性生理免疫”（Chester *et al.*，1991）。传统研究中发现的诱导物可以归结为以下几类：植物病原菌、植物体的代谢产物、化学合成物质及非相容性病原物（吴跃开，2006）。但是，这些诱导物本身对目标植物或多或少具有潜在的致病性或毒性，其使用范围也就受到了限制。在这种情况下，PGPR作为诱导物的研究就受到学者的重视。据报道，荧光假单胞菌菌株*Pseudomonas* WCS417（van Peer *et al.*，1991）、*P. fluorescens*（Alstrom，1991）和*P. fluorescens* CHAO （Zhou，1994）对植物病害有一定的诱导抗性。芽胞杆菌GFP-JK-2不能侵染香蕉组培苗，这就排除了芽胞杆菌GFP-JK-2在植株体内对病原菌的直接拮抗作用，本节中作者对芽胞杆菌GFP-JK-2和香蕉枯萎病病菌设置不同的处理并测定不同的与植物抗性相关的不同的酶活性或物质的含量，研究芽胞杆菌GFP-JK-2对香蕉枯萎病的诱导抗性，旨在探索供试生防菌与香蕉枯萎病病菌混合接种对香蕉组培苗抗性相关酶活性的影响，为香蕉枯萎病生防机理研究提供科学依据，为香蕉枯萎病防治提供新的途径，同时对平衡农田生态系、促进农业可持续发展具有一定的意义。研究方法如下。

二、研究方法

实验材料：GFP-JK-2 菌株，香蕉组培苗，LB 培养基，红霉素（Erythromycin），香蕉枯萎病病菌（*F. oxysporum* f. sp. *cubense*）。发酵液的制备：菌株 GFP-JK-2 在 LB 培养基（含 10μg/mL 红霉素）37℃培养 24h，接到 LB 液体培养液（含 10μg/mL 红霉素）中 30℃、170r/min 培养 48h，GFP-JK-2 菌液计数为 1×10^8CFU/ml。病原菌芽胞悬浮液计数为 1×10^6CFU/ml，接种方法及处理设置：设 5 个处理，即未处理的香蕉组培苗编号为 CK、接种 GFP-JK-2 的香蕉组培苗编号为 GFP-JK-2、接种香蕉枯萎病病菌的香蕉组培苗编号为 P370、接种 GFP-JK-2 在 24h 后接种香蕉枯萎病病菌的香蕉组培苗编号为 P+J（1）、同时接种 GFP-JK-2 和香蕉枯萎病病菌的香蕉组培苗编号为 P+J（0）。采用伤根法每瓶组培苗接种菌液或芽胞悬浮液 100μl。在 30℃，12h 黑暗 12h 光照培养。

三、芽胞杆菌和枯萎病病菌对香蕉苗多酚氧化酶（PPO）活性的影响

实验结果见图 6-63～图 6-65。从图 6-63 可以看出，不同处理香蕉组培苗根部 PPO 活性的变化。所有的处理在 1～24h 内，香蕉组培苗根部的 PPO 活性均有明显的上升趋势，其中仅 P370 处理的升高最为明显；2d 以后，P370 处理和 P+J（0）的香蕉组培苗根部的 PPO 活性下降并且在 4d 以后趋于稳定。可能是由于受到香蕉枯萎病病菌的胁迫而导致相同的趋势，这说明同时接种病原菌和芽胞杆菌生防菌 GFP-JK-2 的处理中，病原菌首先对植株根部产生胁迫作用；GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗根部的 PPO 活性一直高于对照，CK 的 PPO 活性在第 4 天时达最大值 14.625U/（g·min），而 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗在第 6 天时达最大值 19.875U/（g·min），是 CK 最大值的 1.36 倍，有效地延长了 PPO 高活性的时间和提高了植株的 PPO 活性；而且从第 4 天开始，GFP-JK-2 处理根部的 PPO 活性均高于对照，这说明 GFP-JK-2 对根部的 PPO 活性诱导在 4d 以后。在 P+J（1）的处理中，在 2～8d 中，其 PPO 活性大都高于 P370 和 P+J（0）处理，而后活性基本与其他处理一致，可能是 GFP-JK-2 诱导作用的结果。

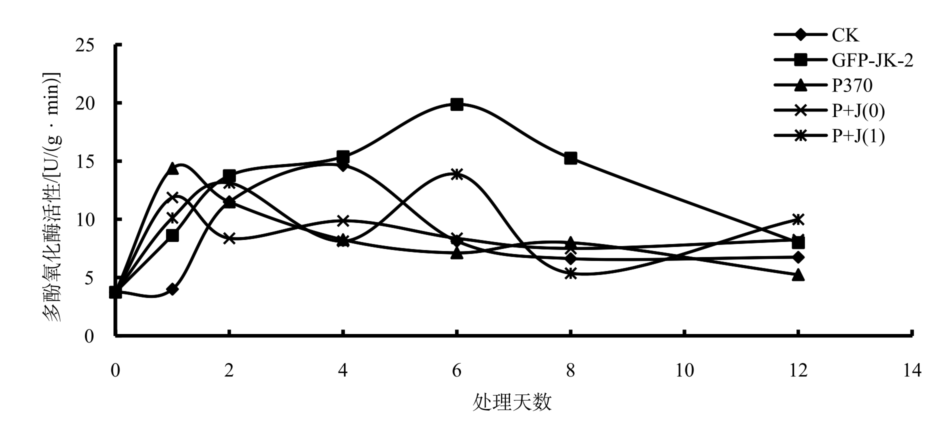


图 6-63　接种香蕉枯萎病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗根部多酚氧化酶活性的变化

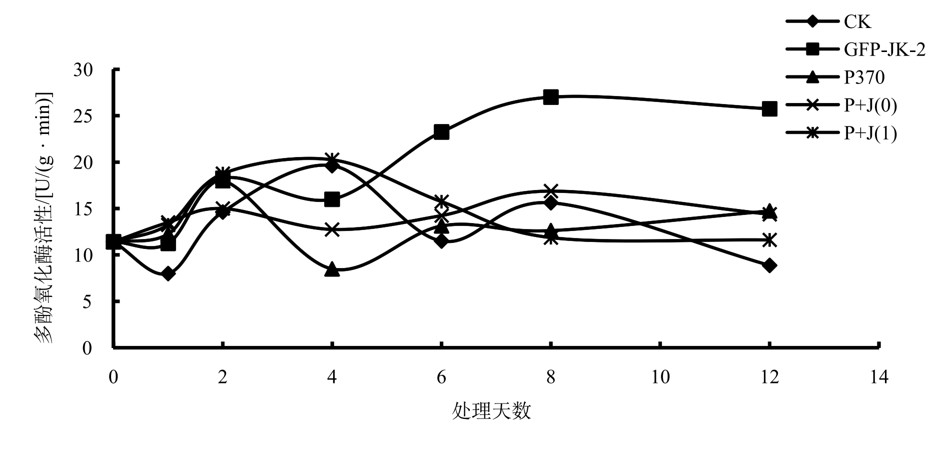


图 6-64　接种香蕉枯萎病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗茎部多酚氧化酶活性的变化

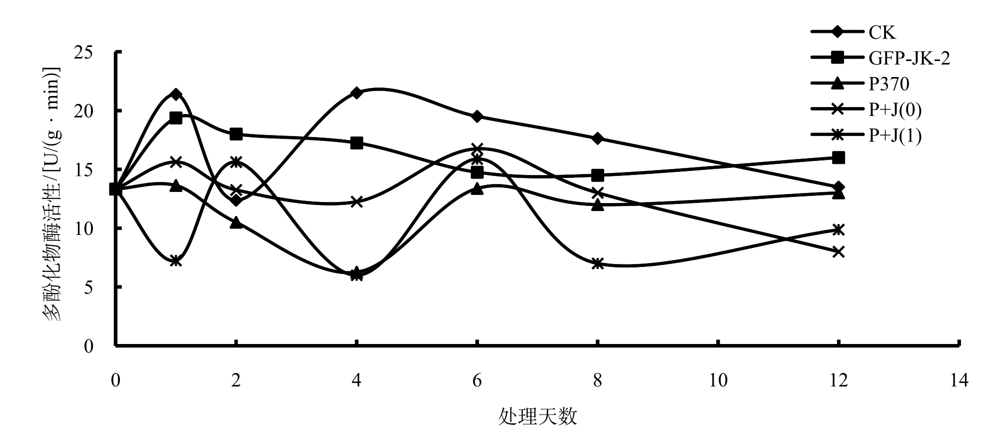


图 6-65　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗叶片多酚氧化酶活性的变化

图6-64为不同处理香蕉组培苗茎部PPO活性的变化。处理芽胞杆菌生防菌GFP-JK-2、P370、P+J（0）和 P+J（1）处理的香蕉组培苗茎部的 PPO 活性与对照相比在 2d 内均升高；P+J(0)处理的香蕉组培苗茎部的 PPO 活性在实验过程中变化不大；在 6d 以后 P370、P+J（0）、P+J（1）和 CK 处理的香蕉组培苗茎部的 PPO 活性基本趋于一致；而 GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗茎部的 PPO 活性则明显高于其他处理，这说明接种 GFP-JK-2 对香蕉组培苗茎部的 PPO 活性的诱导主要表现在 6d 以后。图 6-65 为不同处理叶片 PPO 活性的变化。在 1d 内， GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗叶片的 PPO 活性与 CK 叶片的 PPO 活性两者均明显升高， P370 和 P+J（0）处理的香蕉组培苗叶片的 PPO 活性稍有升高，而 P+J（1）处理的香蕉组培苗叶片的 PPO 活性则明显下降；在 4d 以后， GFP-JK-2 处理的香蕉组培苗叶片的 PPO 活性与 CK 叶片的 PPO 活性变化不大；而其他处理变化幅度较大，可能是由于病原菌和拮抗菌相互作用的结果及病原菌对植株的致病作用。

四、芽胞杆菌和枯萎病菌对香蕉苗过氧化物酶（POD）活性的影响

实验结果见图 6-66 和图 6-67。从图 6-66 可以看出不同处理根部 POD 活性的变化。

P370、P+J（0）处理在 1～2d 内明显升高；这说明可能是由于病原菌起作用，也说明同时接种病原菌和拮抗菌时，病原菌首先对植株的 POD 活性产生影响，而后两者的 POD 活性迅速下降； GFP-JK-2 处理的 POD 活性在第 4 天达最大值，为 16.6U/（g·min），而后稍有下降但明显高于其他处理，说明 GFP-JK-2 对根部的 POD 活性诱导在 4d 以后。

图 6-67 为不同处理茎部 POD 活性的变化。由图 6-67 可知， P+J（0）、P+J（1）处理的 POD 活性在 1d 内均迅速升高，明显高于 GFP-JK-2 和 CK 处理的 POD 活性而后又迅速下降； P370 处理的茎部 POD 活性在 1～4d 内低于 CK 的 POD 活性而在以后逐渐升高,在第 8 天的 POD 活性与 GFP-JK-2 处理的活性相当。这可能是由于病原菌在植物体内产生适量的毒素有助于提高植株的 POD 活性。GFP-JK-2 处理的茎部 POD 活性在第 8 天达最大值，为 1.91U/（g·min），说明 GFP-JK-2 对 POD 活性的诱导在第 8 天左右。

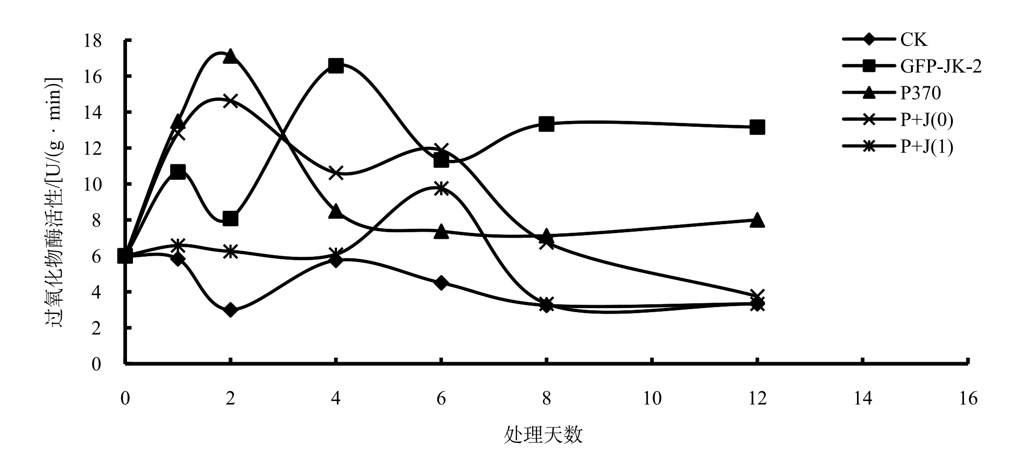


图 6-66　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗根部过氧化物酶活性的变化

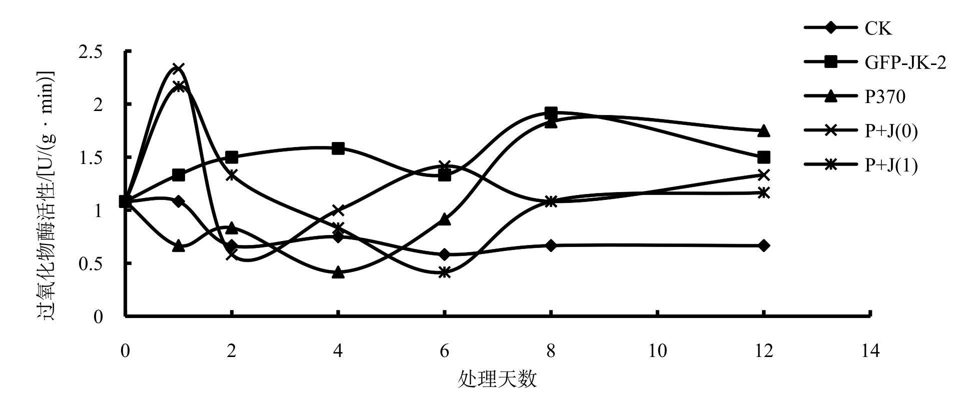


图 6-67　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗茎部过氧化物酶活性的变化

五、芽胞杆菌和枯萎病病菌对香蕉苗超氧化物歧化酶（SOD）活性的影响

实验结果见图 6-68 和图 6-69。从图 6-68 可以看出不同处理根部 SOD 活性的变化。芽胞杆菌生防菌 GFP-JK-2、P370 与 CK 处理的 SOD 活性变化趋势基本一致， P370 处

理的活性降低明显；其他处理变化不明显。P+J（0）和 P+J（1）处理根部 SOD 活性明显降低，尤其是 P+J（1）在 6～8d 的 SOD 活性接近于零。这说明无论是单独接种拮抗菌还是病原菌对香蕉组培苗的SOD 活性影响不大。而同时接种两种菌后均导致根部SOD 活性的降低。图 6-69 为不同处理茎部 SOD 活性的变化。由图 6-70 可知， P+J（0）、P+J（1）及 P370 处理的 SOD 活性在 1d 内均高于 GFP-JK-2 和 CK 处理的 SOD 活性。与根部相反，可能是由于接种后， P+J（0）、P+J（1）及 P370 处理接种浓度过大，而导致根部的 SOD 活性降低，而有利于茎部 SOD 活性的提高，适于植物激素存在“高剂量抑制、低剂量促进”的说法。

图 6-70 为不同处理叶片 SOD 活性的变化。由图 6-70 可知， P370 处理的植株叶片的 SOD 活性明显高于其他处理，而其他处理的 SOD 活性与 CK 相比变化不大。

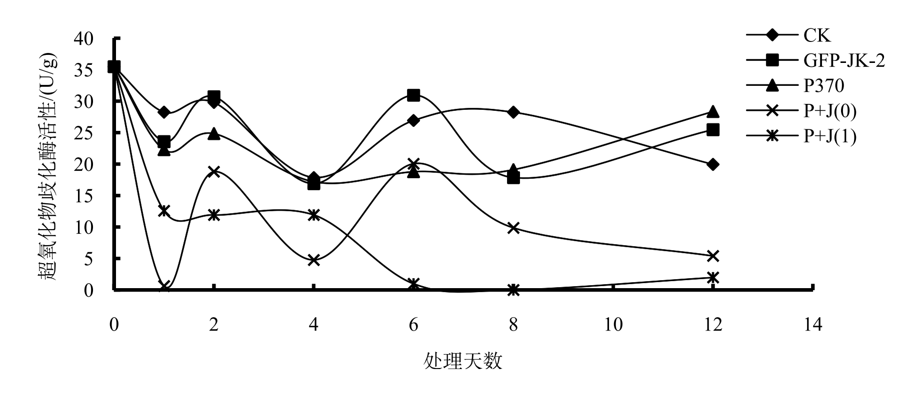


图 6-68　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗根部超氧化物歧化酶活性的变化

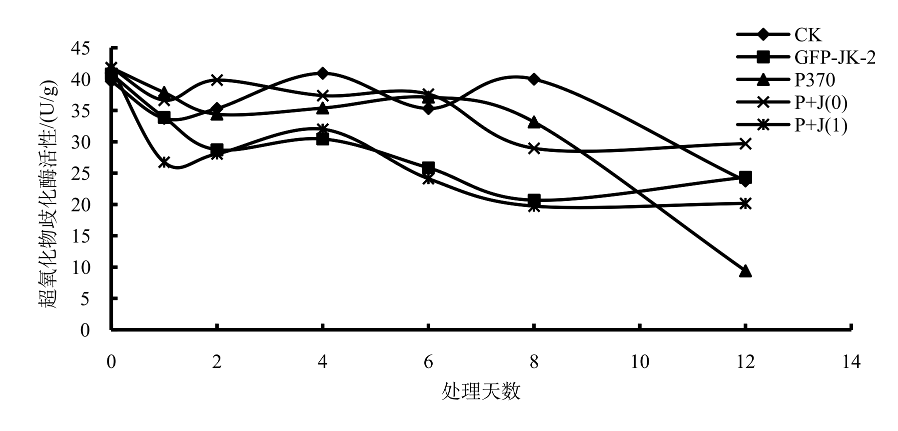


图 6-69　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗茎部超氧化物歧化酶活性的变化

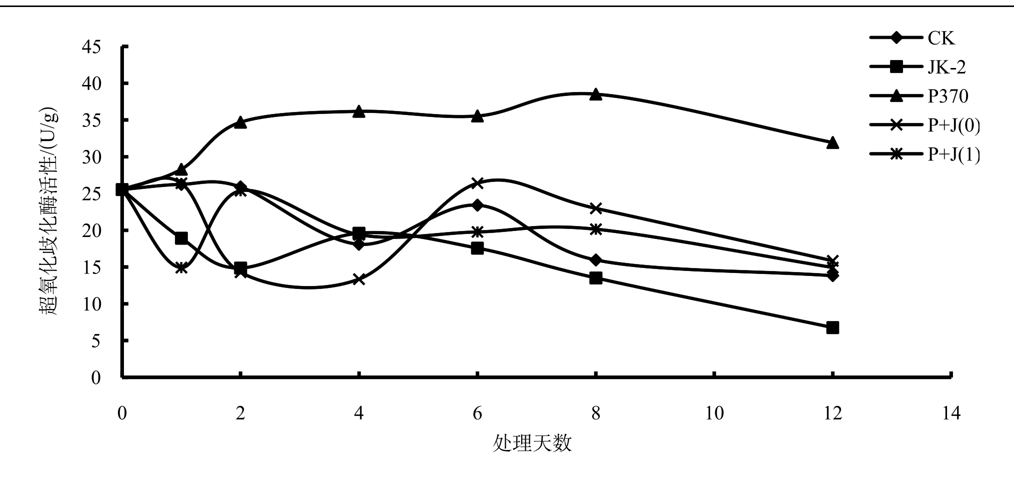


图 6-70　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗叶片超氧化物歧化酶活性的变化

六、芽胞杆菌和枯萎病病菌对香蕉苗丙二醛（MDA）含量的影响

实验结果见图 6-71～图 6-73。从图 6-71 可以看出不同处理根部 MDA 含量的变化。在 P+J（0）的处理中，植株在 1～24h 的时间内 MDA 的含量迅速升高，而其他处理的含量变化基本一致，可能是两者相互作用的结果，并且在 6d 时又使 MDA 含量达第二个高峰；在 P+J（1）的处理中，在 1～6d 其 MDA 含量一直处于上升状态，在 6d 时达最大值，为 0.151μmol/L；接种香蕉枯萎病病原菌 P370 的 MDA 含量与接种芽胞杆菌生防菌 GFP-JK-2、CK 的 MDA 含量在 1～6d 变化不大，而在 6～12d 接种 GFP-JK-2 与 P370 的 MDA 含量均升高而后下降，而对照的含量下降后趋于稳定；处理后的香蕉组培苗的 MDA 含量基本高于对照，这说明可能是由于接种菌株对其起到胁迫的作用，使其 MDA 含量升高。图 6-72 为不同处理茎部 MDA 含量的变化。

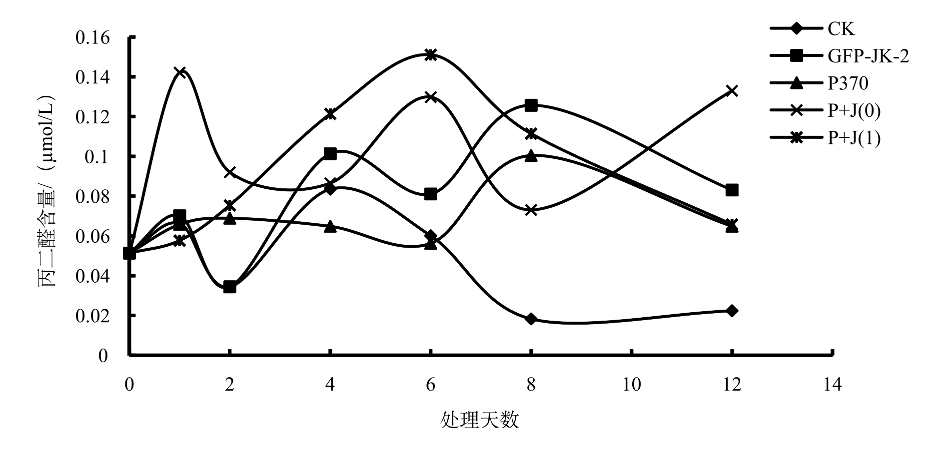


图 6-71　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗根部丙二醛含量的变化

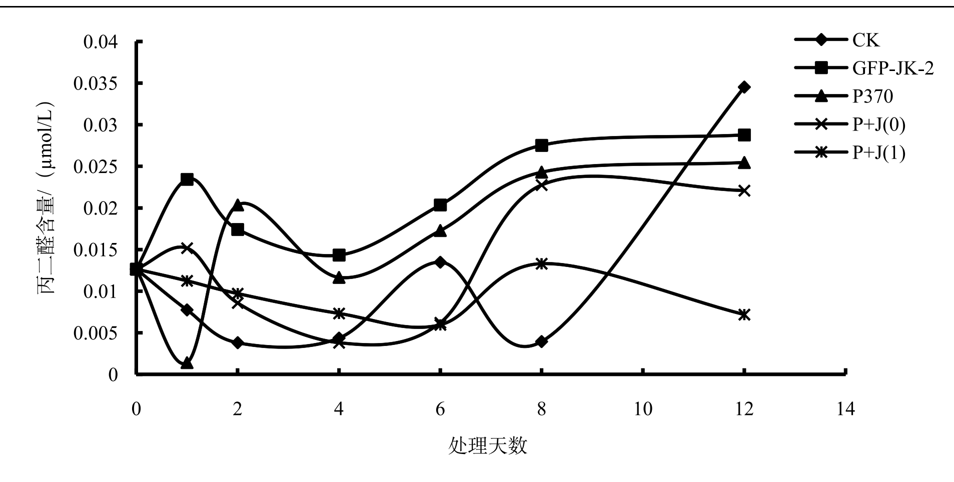


图 6-72　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗茎部丙二醛含量的变化

由图 6-72 可知，接种 GFP-JK-2 及 P+J（0）、P+J（1）的 MDA 含量在 1d 内均升高而只有接种 P370 的 MDA 含量降低而后又迅速升高，在第 2 天以后含量与经 GFP-JK-2 处理后的相当；在第 12 天时，对照的 MDA 含量迅速升高，高于所有的处理，说明经过处理的香蕉组培苗茎部的 MDA 含量变化幅度减小。图 6-73 为不同处理叶片 MDA 含量的变化。由图 6-73 可知，接种香蕉枯萎病 P370 的植株叶片的 MDA 含量在第 4 天时达 0.330μmol/L，其对叶片的 MDA 含量影响较大，基本都高于其他处理，使叶片生物膜的受害程度较大，降低了植物的抗逆性，而其他处理 MDA 的含量基本上都高于对照，P+J（0）和 P+J（1）都低于 P370 处理的 MDA 含量，与 GFP-JK-2 处理的含量相当，这可能是接种 GFP-JK-2 对其产生的影响。

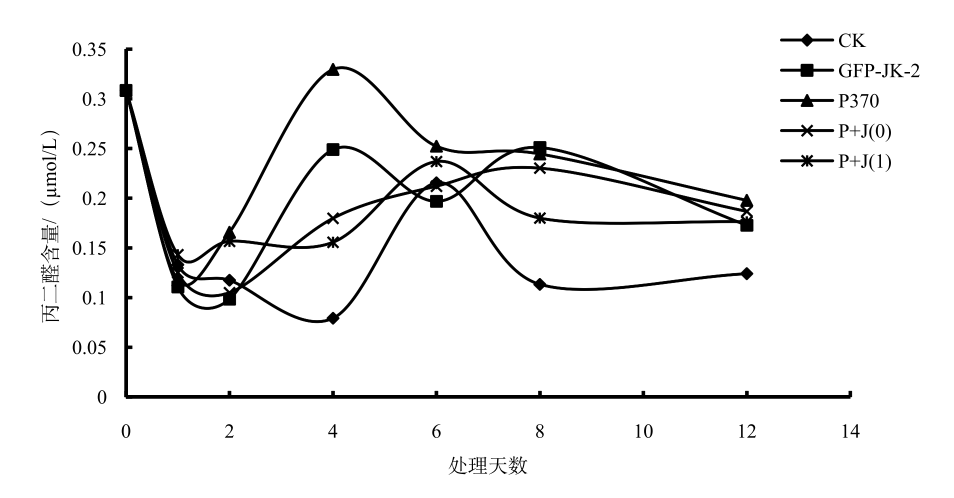


图 6-73　接种香蕉枯萎病病菌和 GFP-JK-2 后香蕉组培苗叶片丙二醛含量的变化

七、讨论

植物诱导抗性是一个多年来吸引众多研究者关注的课题（Kuc *et al.*，1977），被真

菌、细菌或病毒侵染后，植物表现出广泛的、长时间的系统性抗性（户勋等，2007）。本节首次报道了短短芽胞杆菌 JK-2 对香蕉组培苗的诱导抗性。通过设置不同的处理研究发现，接种 GFP-JK-2 能有效地提高植株 PPO 和 POD 活性，而病原菌及生防菌和病原菌混合接种的处理均使上述两种酶的活性不同程度降低。这说明接种 GFP-JK-2 有利于提高植株的抗病性，具有一定的诱导抗性。本实验室下一步将着力于发现和分离这些具有诱导抗性的代谢产物。目前许多研究认为，诱导抗性有两种类型：一类是由病菌无毒株或无毒基因产物和一些化学因子诱导的系统获得性抗性（SAR）（蔡新忠等，1999；Neuensehwander *et al.*，1996），这类诱导抗性由诱导因子诱发植物 *SAR* 基因表达，产生一系列防御反应如病程相关蛋白（PR）等，并由水杨酸介导。另一类是由根际促生菌（PGPR）引起的诱导系统性抗性（ISR）（van Loon *et al.*，1998），通常 PGPR 诱导的 ISR 是由种子处理或土壤浇灌获得（Liu *et al.*，1995）。接种 GFP-JK-2 对根的 SOD 活性的影响不明显，使茎、叶的 SOD 活性降低。但是仅致病菌处理的茎叶的 SOD 活性明显高于其他处理，尤其是叶片的 SOD 活性。因此对于致病菌对植物抗性的影响也有待于进一步深入研究。可能适度的病原菌胁迫有利于提高植株的抗病性。无论是单独接种 GFP-JK-2 还是单独接种香蕉枯萎病病菌均提高了 MDA 含量，这不利于植物抗病和逆境的环境。但是混合接种生防菌和病原菌的 MDA 含量变化不明显，所以生防菌和病原菌接种的浓度比例有待于进一步研究，使两者结合更有利于提高植物的抗病和在逆境中生存的能力。

第八节　芽胞杆菌对番茄青枯病的防治作用

一、概述

对青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 及其 *gfp* 标记菌株的定殖特性进行了一系列的研究，确定了蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的内生特性，并对其对番茄生理生化的影响进行了研究，得到了比较乐观的结果，也通过标记菌株研究了其在不同土壤中的定殖适应性及其对土壤微生物的影响，因此蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 标记菌株与原始菌株对番茄青枯病的防效有无差异是一个有必要核实的问题。研究方法如下。

二、研究方法

1）供试菌株。供试生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 的 *gfp* 标记菌株蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20。供试病原菌为青枯雷尔氏菌 FJAT-91，为福州北峰番茄上分离到的病原菌，由本实验室分离保存。供试番茄品种为‘瑞潘 007’。

2）不同浓度 FJAT-91 青枯雷尔氏菌液对番茄的致病试验。①病原菌液的制备：挑取青枯雷尔氏菌单菌落于装有 25ml SPA 培养液的 250ml 三角瓶中，置于 30℃，200r/min 摇床培养 48h，计数后根据菌悬液浓度进行稀释，得到浓度为 10^{-2}CFU/ml、10^{-4}CFU/ml、10^{-6}CFU/ml、10^{-8}CFU/ml 的菌液，备用。②对番茄的青枯病致病试验：采用伤根灌根法，取 6～7 叶期番茄盆栽苗，设 4 个处理，分别用 40ml 对应 4 个浓度梯度的青枯雷尔氏菌

液对番茄进行灌根处理，处理前用灭菌剪刀在每株番茄根围剪一下，每处理 10 株，重复 3 次，对照用无菌水代替菌液。之后每天观察记录番茄发病情况。

3）蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 及其 *gfp* 标记菌株对番茄青枯病的防效。①生防菌液的制备：将常温保存的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌株于 LA 培养基上活化；分别挑取单菌落于 LB 培养液中，置于 30℃，200r/min 摇床上培养 24h，稀释 1000 倍，用血球计数板进行计数，计算菌悬液浓度，再根据菌悬液浓度进行稀释，得到 10^8CFU/ml、10^6CFU/ml 两个浓度的菌液，备用。②番茄盆栽苗的处理：取 6～7 叶期番茄盆栽苗，本试验设 5 个处理，处理一到处理五分别用 40ml 浓度为 10^8CFU/ml、10^6CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液预处理后接青枯雷尔氏菌，用 40ml 浓度为 10^8 CFU/ml、10^6CFU/ml 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 菌液预处理后接青枯雷尔氏菌，用 40ml 清水预处理后接青枯雷尔氏菌，每处理番茄 20 株。生防菌处理后 2d 用 40ml 浓度为 10^4CFU/ml 的青枯雷尔氏菌菌株 FJAT-91 菌液灌根，另设一组空白对照不进行任何处理，计算校正防效。

$$\text{防治效果}(\%)=\frac{\text{对照发病率}-\text{处理发病率}}{\text{对照发病率}}\times 100\% \tag{6-9}$$

三、青枯雷尔氏菌液对番茄的致病试验

不同浓度青枯雷尔氏菌菌株 FJAT-91 菌液对番茄的致病试验见表 6-25，可以看出，浓度为 10^6CFU/ml 处理的番茄苗最先发病，在第 3 天有一株出现萎蔫，到第 5 天，4 个不同浓度处理的番茄苗均出现病株，到第 8 天，10^2CFU/ml 处理的番茄苗发病率达 40%CFU/ml，10^4CFU/ml、10^6CFU/ml、10^8CFU/ml 处理的番茄苗发病率一致，均为 90%。

表 6-25　不同浓度青枯雷尔氏菌 FJAT-91 菌液接种条件下番茄青枯病发病率

处理	菌液浓度				
	10^2CFU/ml	10^4CFU/ml	10^6CFU/ml	10^8CFU/ml	CK
第 2 天	0	0	0	0	0
第 3 天	0	0	10 %	0	0
第 4 天	0	10 %	40 %	30 %	0
第 5 天	10 %	50 %	70 %	80 %	0
第 6 天	10%	50 %	70 %	80 %	0
第 7 天	20 %	80 %	90 %	80 %	0
第 8 天	40 %	90 %	90 %	90 %	0

四、芽胞杆菌对番茄青枯病的防效测定

蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 及其 *gfp* 标记菌株对番茄青枯病的防效测定见表 6-26，不同浓度的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 均可以推迟番茄青枯病发病，10^8CFU/ml、10^6CFU/ml 浓度的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞

杆菌 ANTI-8098A:pCM20 均能推迟番茄青枯病的发生。

表 6-26 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和 ANTI-8098A:pCM20 菌株生防效果测定

处理		生防效果变化动态					
		生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A		*gfp* 标记生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20		CK	
		10^8CFU/ml	10^6CFU/ml	10^8CFU/ml	10^6CFU/ml	接种病原菌	不接种
第 9 天发病率%		0	0	0	0	5	0
第 10 天发病率%		0	0	0	0	5	0
第 11 天发病率%		0	10	5	10	15	0
第 12 天发病率%		0	15	5	10	25	0
第 13 天发病率%		0	15	5	10	30	0
第 14 天	发病率%	0	15	5	15	35	0
	防治效果%	100	57.1	85.7	57.1	—	—
	校正防效%	100	57.1	85.7	57.1	—	—
第 15 天	发病率%	35	20	30	25	60	0
	防治效果%	41.7	66.7	50	58.3	—	—
	校正防效%	41.7	66.7	50	58.3	—	—

第 9 天，只接种病原菌处理组开始发病，10^8CFU/ml 浓度的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 可以推迟 6d 发病，其余 3 个处理可以推迟 2d；第 14 天，浓度为 10^8CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液校正防效分别可以达 100% 和 85.7%，10^6CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 均为 57.1%；第 15 天，10^8CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液校正防效分别为 41.7%和 50%，10^6CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 校正防效分别为 66.7%和 58.3%。

五、讨论

不同浓度青枯雷尔氏菌菌株 FJAT-91 菌液致病试验说明，高浓度的病原菌菌液不一定最先导致青枯病的发生，本试验中 10^6CFU/ml 浓度的菌液比 10^8CFU/ml 更早发病，有可能是浓度过高，病原菌之间存在激烈的营养和空间竞争。而 10^2 CFU/ml 浓度的菌液也会导致番茄青枯病的发生，只是发病较慢且发病率较低。因此在接下来的生防试验中选择了浓度为 10^4CFU/ml 的青枯雷尔氏菌液，既缩短了试验周期，又保证了番茄青枯病的发生。不同浓度的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 均可以推迟番茄青枯病发病，浓度为 10^8CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20A 菌液分别推迟发病 6d 和 2d。第 14 天，浓度为 10^8CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A: pCM20 菌液相对防效可以达 100%和 85.7%，第 15 天分别为 41.7%和 50%，10^6CFU/ml 的蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A

和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 菌液防效分别为 66.7%和 58.3%。根据以前的研究结果，10^2CFU/ml 浓度的 FJAT-91 青枯雷尔氏菌菌液就可以引起青枯病发病，试验所用青枯雷尔氏菌菌液浓度为 10^4CFU/ml，生物防治的特点就是将有害生物控制在最低水平，而不是将其完全消灭，此外，土壤理化性质及其中的其他微生物等外界因素也会影响其生防效果。综上所述，蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A:pCM20 对番茄盆栽苗青枯病的相对防效差异不大，对番茄青枯病均有较好的防效。苗则彦等（2009）研究表明，生防菌浓度过高会抑制植株生长。黎起秦等（2006）研究表明，当植株根、茎中的 B47 达一定的量时对番茄青枯病有较好的防治效果。接种生防菌 17d 后再接种青枯雷尔氏菌防效较高，而同时接种生防菌和青枯雷尔氏菌时防效很低，因此，生防菌在使用时要充分考虑菌量、时间等问题。

第九节　芽胞杆菌对西瓜枯萎病的防治作用

一、概述

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型（*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *niveum*）引起的维管束病害，通过土壤、种子传播。厚垣孢子在土壤中存活 10 年以上，离开寄主的情况下也能存活 5～6 年。西瓜枯萎病症状表现在幼苗定株以后，开始出蔓到果实半大期间，茎的内部变为褐色，全蔓或部分支蔓白天萎蔫，夜间恢复正常，5～6d 后即枯死，是造成西瓜减产的重要病害。对于西瓜枯萎病的防治，田间主要采用轮作和化学药剂，尤其是化学药剂防治目前是西瓜枯萎病防治的主要手段。但由于该病属土传病害，容易使病原菌产生抗药性，给防治工作带来困难，造成田间防治效果普遍较差，而且杀菌剂易造成农药残留，对生态环境和人体健康造成危害。因此，在防治西瓜枯萎病的诸多措施中，生物防治由于具有见效快、无污染等优点成为重要的防治方法之一。

20 世纪 80 年代以来，国内外植病生防中对枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）的报道较多，涉及的防治对象有作物的叶部病害、土传病害和果实病害。生防枯草芽胞杆菌对人畜无害，不污染环境，培养方便，生长周期短，并能产生杆菌肽、大环脂、环脂、类噬菌体颗粒等多种抗菌物质，可在根系土壤中繁殖，极具开发应用价值。在西瓜枯萎病生物防治的研究中，国内外已报道的生防菌有弱毒或非致病性的尖孢镰刀菌、菌根菌、木霉、假单胞菌、芽胞杆菌、放线菌及其产生的抗生素等，其中研究最多的也是枯草芽胞杆菌。

枯草芽胞杆菌 NH-BS-2000 是福建省农业科学院农业生物资源研究所从西瓜根际土壤分离得到的一个拮抗菌株，经试验表明该菌株对镰刀菌具有很强的抑制作用，并完成了菌株的室内生物活性测定、液体发酵条件的研究。为了探讨该菌株在田间的防治效果及对西瓜苗的促长作用，作者于 2005 年在福建省福州永泰进行了生防菌 NH-BS-2000 防治西瓜枯萎病的田间试验，现将结果报道如下。

二、研究方法

1. 材料

供试菌株为生防菌 NH-BS-2000（*B. subtilis*），由福建省农业科学院农业生物资源研究所菌种室提供。对照药剂为20%三环唑可湿性粉剂（常州市丰登农药厂生产），维线克微胶囊剂（福建省绿波生化有限公司试产）。试验地点为福州永泰。供试作物为西瓜（‘早春红玉’品种），2005 年 2 月 25 日浸种，2005 年 2 月 26 日营养袋播种，2005 年 3 月 24 日移栽。

2. 方法

1）生防菌 NH-BS-2000 发酵液的制备。生防菌 NH-BS-2000 培养基为牛肉膏-蛋白胨（NA）培养基，发酵罐为本室自行设计的 70L NH-SF01 型网络监控生物反应器。发酵采用二级发酵：将斜面保存的 NH-BS-2000 菌种接种到新鲜的斜面培养基上，经 30℃活化培养 18h 后制成菌悬液，按 5%接种量接种到种子罐；种子发酵 12h 后，将种子液移入网络监控生物反应器发酵，发酵参数为搅拌器转速 220r/min，pH7.5，罐温（30±1）℃。每隔 8h 取样一次，用血球计数法测定各样品的菌体数。生防菌 NH-BS-2000 发酵液最终含量为 3.3×10^{10}CFU/g。

2）田间小区试验。试验时间为 2005 年 2～4 月。试验共设 3 个处理：生防菌 NH-BS-2000 发酵液 50 倍液灌根，三环唑 600 倍液灌根，维线克 800 倍液灌根；于 3 月 11 日用各处理液浇灌在营养袋内的西瓜苗；3 月 24 日对刚移栽后的西瓜苗进行灌根处理，每株苗药液施用量为 250ml。每个处理约 17 株苗为一个小区，在大棚内随机排列，各处理重复 5 次，以清水为对照。施肥与田间管理均按常规进行。

3）生防菌 NH-BS-2000 对西瓜苗期枯萎病的防治效果及对土壤微生物群落的影响。于 4 月 7 日调查西瓜苗的生长状况，计算各处理与对照西瓜苗的发病株率。按多点取样法，于各处理与对照发病西瓜苗根际 0～20cm 范围内挖取土样，每种处理样点不少于 5 个，混合均匀后带回，过筛后置于 5℃冰箱中备用；同时取样生防菌 NH-BS-2000 处理组的健康植株根际土壤为对照。根据邓欣等（2005）的方法检测真菌、细菌和放线菌，观察不同处理对土壤微生物群落的影响。

4）生防菌 NH-BS-2000 对西瓜成株期枯萎病的防治效果及其促进生长作用。于 2005 年 4 月 24 日调查已成株西瓜植株的生长状况，根据病害发展程度确定发病级别；计算各小区的发病株率，调查防治效果；同时，每小区取样健康植株 5 株，测量株高（最长茎蔓的长度）、叶片数、着花数、着果数、叶长、叶宽，调查不同处理对西瓜植株的促长效果。

发病分级标准：0 级，健株，长势良好无病征；1 级，病株叶片自下而上逐渐萎蔫，似缺水状，中午更为明显，早晚尚能恢复；2 级，病株叶片萎蔫，不能再恢复正常；3 级，整株叶片呈发黄枯萎下垂，不能再恢复正常，叶片枯黄至全株死亡。

$$防治效果（\%）=\frac{对照发病株率-处理发病株率}{对照发病株率}\times 100\%$$

三、芽胞杆菌对西瓜苗期枯萎病防治效果

实验结果见表 6-27。用生防菌 NH-BS-2000、三环唑和维线克三种药剂灌根处理刚移栽的西瓜苗，14d 后西瓜苗的死亡率分别为 7.40%、11.25%和 12.04%，均极显著低于对照的 19.6%（$P<0.01$），其中生防菌 NH-BS-2000 的校正防效为 61.62%，高于三环唑和维线克的 41.65%和 37.55%。

表 6-27　生防菌 NH-BS-2000，三环唑和维线克对西瓜苗枯萎病的防治效果

处理	西瓜苗总数/株	死亡数/株	死亡率/%	防治效果/%
A（生防菌）	81	6	7.40b	61.62
B（三环唑）	80	9	11.25ab	41.65
C（维线克）	83	10	12.04ab	37.55
对照	83	16	19.28a	

注：在同一列内，带相同字母的数字在 Duncan's 新复极差测验的多重比较 $P<0.01$ 时没有显著差异

四、芽胞杆菌对土壤微生物群落的影响

对 3 种处理及清水对照的发病植株采样分析发现（图 6-74），生防菌 BS-NA2000 处理组苗长势均较其他处理组健壮，根系较发达，有部分根系受侵染后变褐；三环唑处理组苗长势较弱，根系不发达，受侵染后根部变褐；维线克处理组苗长势最弱，根系不发达；清水对照组根系较发达，但是根部也被侵染成褐色。

图 6-74　不同处理组西瓜苗发病株生长情况

由左至右依次为：三环唑处理株、生防菌 NH-BS-2000 处理株、维线克处理株、清水对照株

土壤微生物群落的分析结果见表 6-28。在各处理及对照的发病死亡西瓜苗的根际土壤中，都存在着较高的镰刀菌含量，其中又以维线克处理和对照处理最高，达 3.8×10^3CFU/g；在生防菌 NH-BS-2000 处理的健康西瓜苗的根系土壤中，镰刀菌的含量也达 2.5×10^3CFU/g，与该处理病株根系土壤的镰刀菌含量相同。病株根际土壤中其他真菌与细菌的种类和含量与健康苗之间差别不明显；但在放线菌含量方面，健康苗根际土壤的放线菌含量（8.5×10^6CFU/g）与病株根际土壤的放线菌含量之间差异显著，例如，比生防菌 NH-BS-2000 处理病株的 3.4×10^6CFU/g 高 2.5 倍，比三环唑处理病株的 0.08×10^6CFU/g 高 106.25 倍。

表 6-28　不同处理发病与健康植株根际土壤的微生物种类和数量

土样	镰刀菌		其他真菌		细菌		放线菌	
	种类	数量/（CFU/g）	种类	数量/（CFU/g）	种类	数量/（CFU/g）	种类	数量/（CFU/g）
生防菌 NH-BS-2000 处理病株	1	2.5×10^3	16	1.9×10^5	29	3.2×10^7	7	3.4×10^6
三环唑处理病株	2	2.5×10^3	19	0.9×10^5	26	0.8×10^7	3	0.08×10^6
维线克处理病株	1	3.8×10^3	17	2.6×10^5	28	2.2×10^7	4	2.3×10^6
对照株	2	3.8×10^3	18	2.0×10^5	30	1.6×10^7	5	0.8×10^6
生防菌 NH-BS-2000 处理健康植株	2	2.5×10^3	15	1.8×10^5	27	2.1×10^7	6	8.5×10^6

五、芽胞杆菌对西瓜成株期枯萎病的防治效果

实验结果见表 6-29。在处理后 30d，清水对照的西瓜植株发病率为 79.10%，生防菌处理组对西瓜枯萎病的防治效果达 83.14%，显著高于三环唑和维线克处理组的 18.09% 和 25.53%（$P<0.01$）。

表 6-29　生防菌 NH-BS-2000、三环唑和维线克对西瓜成株期枯萎病的防治效果

处理	病征严重程度/株				总株数	病株数	发病率/%	校正防治效果/%
	0 级	1 级	2 级	3 级				
生防菌 NH-BS-2000	62	6	2	2	75	10	13.33c	83.14
三环唑	25	28	8	10	71	46	64.79b	18.09
维线克	30	20	14	9	73	43	58.90b	25.53
对照	14	33	12	8	67	53	79.10a	-

注：在同一栏内，带相同字母的数字在 Duncan’s 新复极差测验的多重比较 $P<0.01$ 时没有显著差异

六、芽胞杆菌对西瓜植株的促长作用

实验结果见表 6-30。在处理后 30d，生防菌 NH-BS-2000 处理的西瓜植株在株高、叶片数、着花数、座果数、叶长和叶宽等都高于清水对照，而且在座果数上表现出显著

性差异（$P < 0.01$）。三环唑处理在促长作用上与清水对照没有表现出显著性差异（$P < 0.01$）；而维线克处理在对植株生长方面与对照没有显著差别，但是在座果数上要显著地低于其他两种处理和清水对照（$P < 0.01$）。

表 6-30　生防菌 NH-BS-2000、三环唑和维线克对西瓜植株的促长作用

处理	株高/cm	叶片数/片	着花数/个	座果数/个	叶长/cm	叶宽/cm
生防菌 NH-BS-2000	187.7ab	19.3ab	9.3a	3.5a	15.5a	13.9a
三环唑	181.0ab	21.0a	8.3a	1.7b	16.8a	15.7a
维线克	109.3b	14.0b	7.3a	0.3c	15.6a	13.8a
对照	180.7ab	18.7ab	7.3a	2.0b	14.8a	13.5a

注：在同一栏内，带相同字母的数字在 Duncan's 新复极差测验的多重比较 $P < 0.01$ 时没有显著差异

七、讨论

目前，利用微生物及其代谢产物等生物农药进行瓜类枯萎病的防治，使用对人体和生态环境无害的生防菌剂替代化学农药已成为世界范围内的发展方向。李晶等（2006）报道通过用 35 亿活芽胞/枯草芽胞杆菌 B29 水剂以浸种、灌根并用的方式防治西瓜枯萎病，田间试验结果表明：枯草芽胞杆菌水剂 250 倍液、500 倍液对西瓜枯萎病具有明显的防治效果，而且还对西瓜植株具有一定的促进生长作用。马艳等（2006）报道了从西瓜植株体内分离得到的内生拮抗枯草芽胞杆菌 BS21 对西瓜枯萎病有显著防效；菌株 BS211 能在辣椒等多种作物体内定殖，有较强的宿主适应性。纪明山等（2002）报道用绿色木霉菌株 TR-8 和芽胞杆菌 1367 发酵物混合后制备成健根宝粉剂以 1:50 拌土在播种时穴施，对西瓜枯萎病的防效达 80%以上，显著高于常用药剂多菌灵和施特灵。此外，健根宝粉剂还对西瓜植株具有一定的促进生长作用。

前期的研究已表明本研究中所采用的枯草芽胞杆菌 NH-BS-2000 对西瓜枯萎病病原菌具有强烈的抑制作用，用生防菌 NH-BS-2000 处理病原菌 8d 后，抑制率均在 62.0%以上，最高抑制率达 80.6%，而且抑制作用的持续性强。本试验表明生防菌 NH-BS-2000 对西瓜苗期枯萎病的防治效果可达 61.62%，高于化学药剂三环唑和维线克的 41.65%和 37.55%，表现在能促进植株根部的生长。在处理 30d 后，生防菌处理组对西瓜枯萎病的防治效果达 83.14%，显著高于三环唑和维线克处理组的 18.09%和 25.53%，表明生防菌比化学农药具有更长的持效期，同时还能促进西瓜植株的株高、叶片数、着花数、座果数、叶长和叶宽等的生长。说明菌株 NH-BS-2000 具备作为枯萎病生防菌的优势，有望开发出瓜类枯萎病的生防菌剂。

研究还发现生防菌 NH-BS-2000 的施用影响了土壤根际的微生物群落，显著提高了放线菌含量。袁虹霞等（1998）通过土壤微生物-棉花枯萎病病菌平板对峙培养，从棉花植株根围土壤中筛选出抑菌效果较好的 6 个菌株，其中 4 个为放线菌，再通过田间小区防效试验，表明这 4 个放线菌的防效为 60.5%～65.1%。杨宇等（2006）报道筛到 4 株放线菌菌株，在田间可有效地控制黄瓜苗期枯萎病，其中 65 号菌株防效最好，其发酵液

10 倍液和 50 倍液的防效分别达 91.8%和 91.4%。本试验发现生防菌 NH-BS-2000 处理后的健康植株根际土壤的放线菌含量显著高于病株的含量，放线菌是对病原真菌具有一定抗性的微生物类群，所以生防菌 NH-BS-2000 对西瓜根际微生物种群的调整作用可能是其具有较高防效的机制之一。

第七章　芽胞杆菌活性功能作用机理

第一节　芽胞杆菌对青枯雷尔氏菌致弱机理

一、概述

野生型青枯雷尔氏菌存在着强致病力菌株和无致病力菌株混杂，前者能引起茄科青枯病，后者能侵入寄主植物，但不引起发病（Liu and Sengonca，2002）。用生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A（蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus*）处理野生型青枯雷尔氏菌，处理后青枯雷尔氏菌全部转化为无致病力菌株，回接寄主不引起发病，这一现象称为致弱现象（Liu and Sengonca，2002）。青枯雷尔氏菌在培养条件下，容易发生致弱现象，张长龄等（1993）报道了青枯雷尔氏菌继代培养 5 代后，丧失致病力。为了探索生防菌对青枯雷尔氏菌的致弱作用与青枯雷尔氏菌因其他因素引起的致弱作用的异质性，研究通过青枯雷尔氏菌弱化指数的建立，比较青枯雷尔氏菌培养致弱、物理致弱、化学致弱、生物致弱之间特性的差异，揭示生防菌致弱特性。芽胞杆菌对青枯雷尔氏菌致弱机理研究方法如下。

二、研究方法

1. 材料

供试菌株：生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 菌株。病原菌为田间采集不同编号的野生型青枯雷尔氏菌株（*Ralstonia solanacearum*）。生防菌对青枯雷尔氏菌致弱作用测定使用 SPA 培养基，青枯雷尔氏菌分离使用 TTC 培养基。物理致弱试验使用 KQ-250DE 型超声波振荡器（昆山市超声仪器有限公司生产），化学致弱试验使用 72%农用链霉素（石家庄曙光制药厂生产），细菌的培养用 HZQ-F160 型全温立式振荡器（哈尔滨东联电子技术开发有限公司生产）。

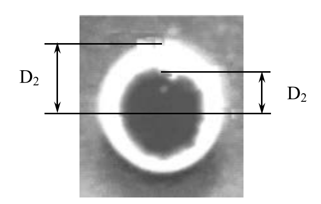


图 7-1　弱化指数的测定

2. 青枯雷尔氏菌的弱化指数

实验用 TTC 培养基，分离从田间采回的患病番茄植株上的青枯雷尔氏菌，经过纯化，进行菌株编号。分离的菌株用剪叶法回接番茄组培苗，各菌株回接 30 株苗，设清水对照，将回接的组培苗置于 30℃人工气候箱下，7d 后观察回接发病率。弱化指数构建：在 TTC 平板培养基上培养青枯雷尔氏菌单细胞菌落，测定中央的红斑半径（D_1）和菌落半径（D_2），弱化指数（N）定义为 $N=D_1/D_2$（图 7-1）。比较编号菌株弱化指数和寄主回接发病率，用二次曲线方程，对青枯雷尔氏菌的发病率（Y）与弱化指数（X）进行拟合，建立发病率与弱化指数方程，划定菌株致病性范围。

3. 青枯雷尔氏菌的培养致弱

1）供试菌株为野生型青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3-010702-01，用 SPA 培养基，摇床培养，转速为 200r/min，温度为（30±1）℃，每 24h 取样一次，共取样 5 次，取出的样品用 TTC 培养基测定弱化指数，同时用剪叶法回接番茄组培苗，各样品回接 30 株苗，设清水对照，将回接的组培苗置于 30℃人工气候箱下，7d 后测定回接发病率，分析培养时间对青枯雷尔氏菌致弱作用的影响。

2）继代培养供试菌株为野生型青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3.010702-12，用 TTC 液体培养基，摇床培养，转速为 200r/min，温度为（30±1）℃，一代培养时间 48h，然后取 1ml 培养液稀释涂板于 TTC 平板培养基，统计强致病力菌株和无致病力菌株所占的比例，测定弱化指数，将弱化指数>0.75 归为无致病力菌株，≤0.75 归为强致病力菌株，统计弱化指数的平均值，同时进行组培苗回接，各代样品回接 30 株苗，设清水对照，将回接的组培苗置于 30℃人工气候箱下，7d 后观察发病率。而后进行下一代的培养，以此类推培养至第 15 代，比较各代的弱化指数、发病率和不同致病性菌株在菌落中的比例变化，分析继代培养对青枯雷尔氏菌致弱作用的影响。

4. 青枯雷尔氏菌的物理致弱

供试菌株为野生型青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3-010703-01，用 TTC 液体培养基，按 10%的装瓶量，4%的接种量，摇床温度为（30±1）℃，转速为 200r/min，培养 48d；发酵液用无菌水配成浓度为 10^9CFU/ml 的菌液，用移液管分别吸取 10ml 至已灭菌的 100ml 三角瓶中，瓶封口放入 KQ-250DE 超声波振荡器中，功率设置为 0.1kHz，进行振荡处理，处理时间设为 5min、10min、15min、20min、25min，以未处理的菌液作为空白对照，各处理重复 3 次；处理后菌液在 TTC 平板上进行涂布，测定弱化指数，统计强致病力菌株和无致病力菌株所占的比例，用菌落计数法计算活菌数；将处理菌株进行番茄组培苗回接，各处理菌株回接 30 株苗，设清水对照，将回接的组培苗置于 30℃人工气候箱下，7d 后观察发病率。实验结果进行 F 显著性检验，分析超声波对青枯雷尔氏菌物理致弱作用的影响。

5. 青枯雷尔氏菌的化学致弱

供试菌株为野生型青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3-010703-01，用 SPA 培养基，摇床培养，转速为 200r/min，温度为（30±1）℃，培养时间 48h，将培养液配制成浓度为 10^9CFU/ml 菌液备用；分别取菌液 10ml 与等量不同浓度的农用链霉素溶液混合，农用链霉素处理浓度设 200.00IU/ml、100.00IU/ml、50.00IU/ml、25.00IU/ml、12.50IU/ml、6.25IU/ml、3.12IU/ml，以清水为对照，各处理重复 3 次，置于（30±1）℃人工气候箱内温育 24h；用 TTC 平板菌落计数法，计数各处理的活菌数，测定各处理菌株的弱化指数，统计强致病力菌株和无致病力菌株所占的比例，用以下公式计算抑制率，实验结果进行 F 显著性检验，分析农用链霉素对青枯雷尔氏菌致弱作用的影响。

$$抑制率（\%）=\frac{对照活菌数-处理活菌数}{对照活菌数}\times 100\%\tag{7-1}$$

6. 青枯雷尔氏菌的生物致弱

供试细菌：生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A、球形赖氨酸芽胞杆菌（*Lysinibacillus sphaercus*）、苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis* Bt9408）、阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）、从土壤分离的未知学名的芽胞杆菌（*Bacillus* spp.）10 株，编号芽胞杆菌 1～10。供试病原菌：野生型青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3.010703-01。用 NA 培养基培养供试细菌，用 SPA 培养基培养青枯雷尔氏菌，按 10%的装瓶量，4%的接种量，摇床温度为(30±1)℃，转速为 200r/min，培养 48d；分别取供试细菌发酵液 5ml，与青枯雷尔氏菌发酵液 5ml 等量混合，以无菌水和 SPA 空白培养基为对照，各处理重复 3 次，于（30±1）℃人工气候箱内温育静置 24h。采用 TTC 平板菌落计数法，计数各处理青枯雷尔氏菌的数量，计算抑制率，测定菌落中不同致病性菌株的弱化指数和比例，将处理后的青枯雷尔氏菌回接到番茄组培苗上，每个处理回接 30 株苗，置于（30±1）℃人工气候箱内，7d 后观察各处理发病情况，统计发病率，用系统聚类分析不同细菌对青枯雷尔氏菌致弱和抑制作用的影响。

三、青枯雷尔氏菌的弱化指数

实验结果见表 7-1。不同代次的青枯雷尔氏菌的不同菌株，弱化指数不同，弱化指数为 0.41～0.88。不同菌株回接番茄组培苗 7d 后的发病率差异显著，发病率为 0%～100%。用二次曲线方程对青枯雷尔氏菌的发病率（Y）与弱化指数（X）进行拟合，得出方程 $Y=-20.1640+558.5039X-628.2977X^2$ （R=0.87255）（图 7-2）。

表 7-1　青枯雷尔氏菌不同菌株的弱化指数与回接发病率的相互关系

野生型			移殖第 1 代			移殖第 2 代		
菌株	弱化指数	发病率/%	菌株	弱化指数	发病率/%	菌株	弱化指数	发病率/%
F-01	0.41	100.0	F-01-F1	0.41	100.0	F-01-F2	0.48	100.0
F-02	0.52	100.0	F-02-F1	0.52	100.0	F-03-F2	0.59	100.0
F-03	0.53	100.0	F-03-F1	0.53	100.0	F-04-F2	0.63	100.0
F-04	0.55	100.0	F-04-F1	0.55	100.0	F-05-F2	0.68	70.1
F-05	0.67	80.3	F-05-F1	0.67	87.5	F-06-F2	0.68	65.2
F-06	0.69	85.6	F-06-F1	0.69	77.8	F-08-F2	0.68	85.0
F-07	0.62	100.0	F-07-F1	0.62	100.0	F-09-F2	0.71	75.1
F-08	0.65	100.0	F-08-F1	0.65	100.0	F-10-F2	0.75	5.3
F-09	0.65	100.0	F-09-F1	0.65	90.0	F-11-F2	0.75	15.5
F-10	0.66	75.5	F-10-F1	0.66	54.5	F-12-F2	0.88	0.0
F-11	0.68	50.3	F-11-F1	0.68	27.3			
F-12	0.86	0.0	F-12-F1	0.86	0.0			

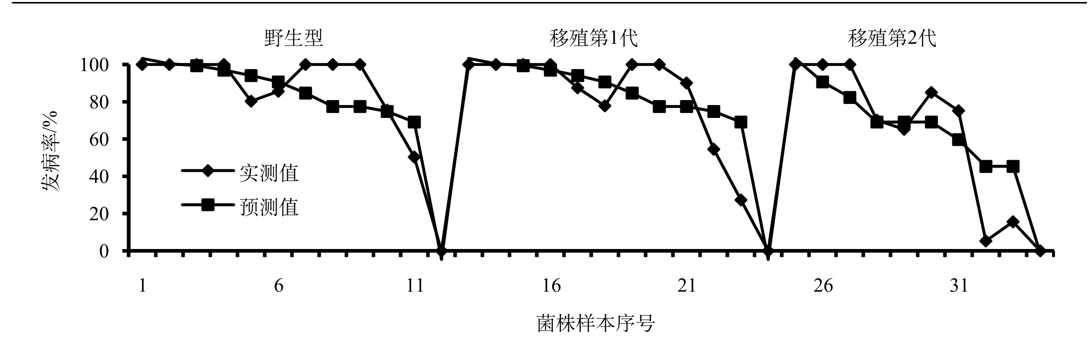


图 7-2　青枯雷尔氏菌不同菌株的弱化指数和回接发病率的实测值与拟合值

曲线拟合结果表明，青枯雷尔氏菌的致病性（回接发病率）与弱化指数存在着特定的相关性，弱化指数<0.60 时，菌株回接发病率为 100%；弱化指数>0.80 时，菌株回接发病率为 0；弱化指数介于 0.60～0.80 时，菌株回接发病率为 5.3%～100%。根据青枯雷尔氏菌的弱化指数与回接发病率的关系，菌株的致病性区间划定如下：①弱化指数<0.60 为致病区，即当青枯雷尔氏菌弱化指数<0.60 时，为强致病力菌株；②弱化指数>0.80 为不致病区，即当青枯雷尔氏菌弱化指数>0.80 时，为无致病力菌株；③弱化指数介于 0.60～0.80 的区域为过渡区，即当青枯雷尔氏菌弱化指数介于 0.60～0.80 时，菌株的致病性为不确定性（图 7-3）。在统计弱化指数时，将弱化指数>0.75 归为无致病力菌株统计，≤0.75 归为强致病力菌株统计。

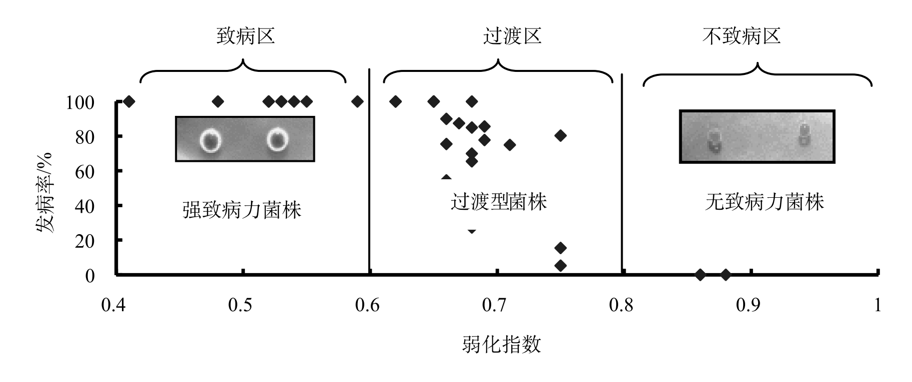


图 7-3　青枯雷尔氏菌的弱化指数与回接发病率的相互关系

四、青枯雷尔氏菌的培养致弱

青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3-010702-01 在 TTC 液体培养基上培养，随着培养时间的增加，活菌数量不断增加，24h 活菌数为（45.5±5.63）×10^8CFU/ml，随后菌体增长量减缓，120d 活菌数达（66.7±6.45）×10^8CFU/ml。培养过程中，青枯雷尔氏菌强致病力菌株所占比例大于 97%，弱化指数为 0.4323～0.5314，都处于致病区。各培养时间的活菌回接实验结果表明，番茄组培苗的发病率为 96.67%～100.00%，保持了较高的致病能力（表 7-2）。供试青枯雷尔氏菌的摇床发酵培养过程中，青枯雷尔氏菌的致病力没

有明显下降，即培养过程对青枯雷尔氏菌无致弱作用。

表 7-2　培养时间对青枯雷尔氏菌强致病力菌株 F.1.3-010702-01 致弱作用的影响

培养时间/h	活菌数/（$\times 10^8$CFU/ml）	弱化指数	回接发病率/%
24	45.5±5.63	0.4323	96.67
48	49.0±4.87	0.5173	100.00
72	60.8±7.26	0.4879	100.00
96	68.3±8.39	0.5211	100.00
120	66.7±6.45	0.5314	100.00
CK	—	—	0.00

青枯雷尔氏菌连续继代培养 15 代的实验结果见表 7-3。实验结果表明，青枯雷尔氏菌 F.1.3-010702-01 菌株含有强致病力菌株（弱化指数介于 0.4126～0.5866）和无致病力菌株（弱化指数介于 0.8045～0.8937）。强致病力菌株和无致病力菌株的比例对于菌株回接发病率影响显著，在继代培养 11 代以前，菌落中强致病力菌株的比例为 93.68%～98.00%，青枯雷尔氏菌 F.1.3-010702-01 菌株未出现明显致弱，各代菌株回接番茄组培苗的发病率为 93%～100%。继代培养 12 代时，强致病力菌株的比例下降到 85.73%，无致病力菌株的比例上升到 14.27%，回接发病率下降为 83.33%；从第 12 代后继续培养，强致病力菌株的比例逐渐下降，回接发病率随之逐渐下降，到继代培养 15 代时，无致病力菌株占优势，比例达 93.26%，强致病力菌株的比例下降为 6.74%，此时回接发病率为 0%。继代培养青枯雷尔氏菌 F.1.3-010702-01 菌株 15 代时，出现培养致弱，与生防菌 24h 致弱青枯雷尔氏菌的行为差异显著。

表 7-3　继代培养对青枯雷尔氏菌菌株 F.1.3-010702-01 致弱作用的影响

培养代次	强致病力菌株		无致病力菌株		回接发病率/%
	弱化指数	比例/%	弱化指数	比例/%	
第 1 代	0.4321	98.00	0.8045	2.00	100.00
第 2 代	0.4856	97.85	0.8211	2.15	100.00
第 3 代	0.5237	98.24	0.8845	1.76	100.00
第 4 代	0.4126	96.76	0.8936	3.24	100.00
第 5 代	0.5611	97.22	0.8321	2.78	100.00
第 6 代	0.5234	95.63	0.8565	4.37	100.00
第 7 代	0.4896	96.11	0.8098	3.89	100.00
第 8 代	0.4423	95.35	0.8926	4.65	100.00
第 9 代	0.5798	95.00	0.8314	5.00	100.00
第 10 代	0.5574	94.12	0.8334	5.88	96.67
第 11 代	0.4922	93.68	0.8126	6.32	93.33
第 12 代	0.5376	85.73	0.8937	14.27	83.33

续表

培养代次	强致病力菌株		无致病力菌株		回接发病率/%
	弱化指数	比例/%	弱化指数	比例/%	
第 13 代	0.5866	43.87	0.8544	56.13	66.67
第 14 代	0.5129	13.07	0.8399	86.93	33.33
第 15 代	0.5698	6.74	0.8926	93.26	0.00
CK	—	—	—	—	0.00

五、青枯雷尔氏菌的物理致弱

用超声波处理不同时间对青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 菌株的生长无显著影响（P<0.01），各处理的活菌数为[（9.04±0.08）～（9.84±0.89）]×10^8CFU/ml；处理组与对照相比较，强致病力菌株的弱化指数和所占比例无显著差异（P<0.01），强致病力菌株的弱化指数为 0.4461～0.5376，强致病力菌株所占的比例为 95.83%～96.14%；超声波处理不同时间的菌株回接番茄组培苗，回接发病率皆为 100%，保持着强致病力菌株的特性（表 7-4）。实验结果表明超声波对青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 菌株无致弱作用。

表 7-4　超声波处理对番茄青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 生长的影响

处理时间/min	活菌数/（×10^8CFU/ml）	强致病力菌株		无致病力菌株		回接发病率/%
		弱化指数	比例/%	弱化指数	比例/%	
5	9.12±0.78A	0.4723±0.45A	95.83A	0.8021±0.76A	4.17A	100.0A
10	9.04±0.86A	0.5198±0.53A	95.83A	0.8125±0.83A	4.17A	100.0A
15	9.67±0.95A	0.4957±0.46A	96.11A	0.8231±0.79A	3.89A	100.0A
20	9.26±0.91A	0.5222±0.51A	95.84A	0.8734±0.85A	4.16A	100.0A
25	9.84±0.89A	0.5376±0.49A	96.14A	0.8326±0.80A	3.86A	100.0A
CK	9.57±0.93A	0.4461±0.47A	95.46A	0.8718±0.88A	4.54A	100.0A

注：相同大写字母表示无显著性差异（P＞0.01）

六、青枯雷尔氏菌的化学致弱

不同浓度的农用链霉素对青枯雷尔氏菌的抑制作用差异显著，随着农用链霉素浓度的增加，对青枯雷尔氏菌的抑制作用逐渐增强，浓度为 100.00IU 时对青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 菌株抑制率达 99%，浓度为 6.25IU 时抑制率为 56.01%。不同浓度的农用链霉素处理青枯雷尔氏菌后，强致病力菌株的比例为 95.13%～98.24%，弱化指数为 0.4429～0.5336，与对照比较，强致病力菌株比例和弱化指数的变化无显著差异（P<0.01），使菌落保持着强致病性特点（表 7-5）。实验结果表明，农用链霉素作为化学物质，对青枯雷尔氏病菌 F.1.3-010703-01 菌株有抑制作用，但无致弱作用。

表 7-5　农用链霉素对青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 菌株致弱作用的影响*

链霉素浓度/IU	处理后活菌数/（$\times10^8$CFU/ml）	抑制率/%	强致病力菌株		无致病力菌株	
			弱化指数	比例/%	弱化指数	比例/%
100.00	0.0987	99.00	0.4526A	98.24A	0.8245A	1.76A
50.00	0.9870	90.00	0.5151A	98.06A	0.8642A	1.94A
25.00	1.4805	85.00	0.5336A	97.22A	0.8098A	2.78A
12.50	2.4675	75.00	0.4429A	96.63A	0.8364A	3.37A
6.25	4.3428	56.01	0.5217A	96.41A	0.8721A	3.59A
3.12	6.7116	32.02	0.5267A	96.35A	0.8615A	3.65A
1.56	9.3567	5.22	0.4901A	95.13A	0.8730A	4.87A
CK	9.8725	0.0	0.4723A	96.62A	0.8121A	3.38A

*表示处理前青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 菌株活菌数为 10^9CFU/ml；相同大写字母表示无显著性差异（$P>0.01$）

七、青枯雷尔氏菌的生物致弱

实验结果见表 7-6。用不同种类的细菌处理青枯雷尔氏菌 F.1.3-010703-01 菌株，处理后青枯雷尔氏菌抑制率、青枯雷尔氏菌不同致病性菌株比例、青枯雷尔氏菌回接发病率存在显著差异。

采用聚类分析，以处理后青枯雷尔氏菌活菌数和抑制率、青枯雷尔氏菌不同致病性菌株的弱化指数和比例、回接发病率为指标，以不同种类细菌为样本，数据经标准化处理，相似系数选用欧氏距离，用最短距离法进行系统聚类。聚类过程见表 7-7，聚类图见图 7-4。聚类结果表明，当 λ=49.1021 时，可将不同细菌分为 3 类，第 1 类具致弱特性，

表 7-6　聚类过程

序号	*I*	*J*	距离
1	8	4	1.8399
2	12	5	2.5010
3	9	4	2.5142
4	10	4	2.5148
5	7	4	3.6119
6	14	4	3.8173
7	15	4	4.4914
8	13	4	4.9489
9	5	4	5.2401
10	16	4	16.6300
11	2	1	20.0668
12	11	3	23.3283
13	6	3	29.9503
14	4	3	49.1021
15	3	1	125.435

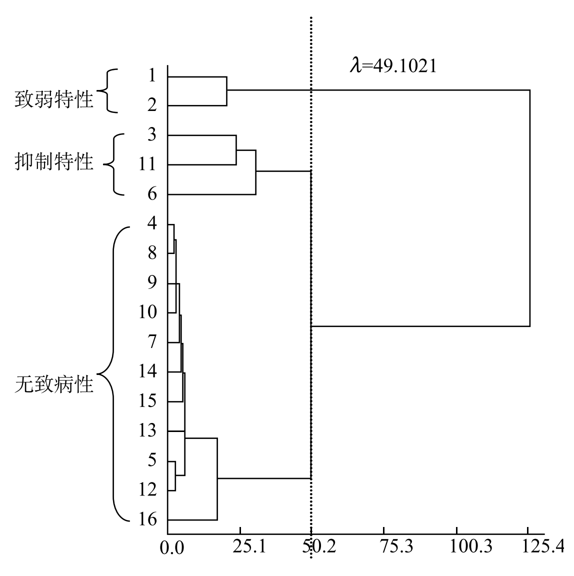


图 7-4　不同种类细菌处理引起强致病力菌株 F.1.3.010703-01 致病性变化的聚类分析

包括青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和球形赖氨酸芽胞杆菌，对青枯雷尔氏菌具有很强的致弱作用，处理后无致病力菌株的比例从对照的3.3%上升为95.17%～98.77%，处理后的青枯雷尔氏菌回接不能引起番茄组培苗的发病，回接发病率为 0%。第 2 类具抑制特性，包括 Bt-9408（*B. thuringiensis*）、芽胞杆菌-2 和芽胞杆菌-7，对青枯雷尔氏菌无明显的致弱作用，处理后无致病力菌株的比例从对照的 3.3%，上升为 13.67%～24.33%，但是具有较强的抑制作用，3 株细菌对青枯雷尔氏菌抑制率为61.05%～84.73%，处理后的青枯雷尔氏菌回接番茄组培苗的发病率显著下降，为 70%～80%。第 3 类对病原菌致病性无影响，无致弱和抑制特性，包括阴沟肠杆菌（*E. cloacae*）和其他未知学名的芽胞杆菌（*Bacillus spp.*），处理青枯雷尔氏菌，对青枯雷尔氏菌的抑制率较低，为 17.89%～37.89%，处理后无致病力菌株的比例为 1.00%～2.00%，与对照 3.3%无显著差异，处理后的青枯雷尔氏菌回接番茄组培苗，发病率都为 100%，与对照相同。

表 7-7　不同种类细菌处理对青枯雷尔氏菌 F.1.3.010703-01 致弱作用的影响

细菌名称	处理后青枯雷尔氏菌		强致病力菌株		无致病力菌株		回接发病率/%
	活菌数/（$\times 10^8$CFU/ml）	抑制率/%	弱化指数	比例/%	弱化指数	比例/%	
1 生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A	28.0	41.49	0.5643	1.23	0.9503	98.77	0.0
2 球形赖氨酸芽胞杆菌	19.5	58.94	0.5014	4.83	0.9043	95.17	0.0
3 Bt-9408	10.0	78.94	0.5927	80.26	0.8501	19.47	75.0
4 阴沟肠杆菌	36.5	23.15	0.5411	98.00	0.8611	2.00	100.0
5 芽胞杆菌-1	30.5	35.79	0.5327	97.35	0.9471	2.65	100.0
6 芽胞杆菌-2	28.0	61.05	0.4834	86.33	0.8780	13.67	80.0
7 芽胞杆菌-3	38.0	20.00	0.4910	98.66	0.8652	1.34	100.0
8 芽胞杆菌-4	36.0	24.21	0.5623	99.00	0.9684	1.00	100.0
9 芽胞杆菌-5	35.0	26.31	0.5019	98.33	0.8695	1.67	100.0
10 芽胞杆菌-6	34.0	28.42	0.5327	97.67	0.8668	2.33	100.0
11 芽胞杆菌-7	31.0	84.73	0.5835	75.67	0.8750	24.33	70.0
12 芽胞杆菌-8	29.5	37.89	0.5328	98.00	0.9333	2.00	100.0
13 芽胞杆菌-9	40.5	14.73	0.4762	99.00	0.8677	1.00	100.0
14 芽胞杆菌-10	39.0	17.89	0.5498	96.52	0.8680	3.47	100.0
15 空白培养基	32.5	31.57	0.5113	95.67	0.8700	4.33	100.0
16 CK	47.5	—	0.5372	96.70	0.8515	3.30	100.0

八、讨论

应用 TTC 平板培养基，培养青枯雷尔氏菌单细胞菌落，构建弱化指数，结合不同弱化指数的青枯雷尔氏菌回接番茄组培苗发病率的分析，确定弱化指数作为致病性指标的

范围，简化了青枯雷尔氏菌致病性变化的测定，为致病性研究提供了量化指标。青枯雷尔氏菌在人工培养的条件下易发生突变，产生致病性的丧失，张长龄等（2008）报道了对青枯雷尔氏菌花生菌株 P9 和芝麻菌株 Ss1 每隔 2d 在斜面上移殖一次，连续移殖 5 次后，在 TTC 培养基上菌落 100%变为红色，即成为无致病力菌株。作者用生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理青枯雷尔氏菌，24h 后在 TTC 培养基上大部分转变为红色，即弱化指数>0.80，回接番茄组培苗不引起寄主发病，成为无致病力菌株，形成致弱作用。这种致弱行为与其他因素引起青枯雷尔氏菌的突变差异显著。

为了区别致弱特性，研究进行了培养致弱、物理致弱、化学致弱和生物致弱的比较。结果表明，对于特定的青枯雷尔氏菌菌株，延长培养时间不会发生致弱作用；在继代培养中，15 代后才出现致弱现象，与生防菌 24h 致弱的行为显著不同；超声波对青枯雷尔氏菌无物理致弱作用；农用链霉素作为化学物质，对青枯雷尔氏菌有抑制作用，但无致弱作用；用不同细菌进行致弱作用试验表明，生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 和球形赖氨酸芽胞杆菌对青枯雷尔氏菌具有较强的致弱作用，其他供试细菌，除了部分细菌具有一定的抑制作用外，无致弱作用，说明致弱作用不是细菌的共性，仅存在于部分生防菌中，为生防菌的特殊性。在生防菌致弱作用的研究过程中，发现野生型青枯雷尔氏菌存在强致病力菌株和无致病力菌株的混杂，生防菌的致弱过程，伴随着强致病力菌株和无致病力菌株所占比例的变化，当强致病力菌株占优势时，菌株表现出致病性，当无致病力菌株占优势时，菌株不表现出致病性，某些生防菌如蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 处理能在短时间内（如 24h）使野生型青枯雷尔氏菌的无致病力菌株占优势，表现出致弱作用。

关于生防菌对青枯雷尔氏菌作用机理的研究有过许多的报道，邱清华等（2002）通过抑菌圈的测定，研究生防菌对青枯雷尔氏菌的抑制作用；郭坚华和潘登明（1995）研究了芽胞杆菌 B130 对生姜青枯雷尔氏菌的拮抗作用；巨大芽胞杆菌 B130-1 对生姜青枯雷尔氏菌抑制作用的研究结果表明，位点竞争作用是其抑菌作用主要原因之一（杨合同等，2002）；自发突变的无致病力番茄青枯雷尔氏菌菌株 Tm3 具有产生细菌素的能力，对防治番茄青枯病的能力表现为诱导抗病作用（董春，1999）。胞外多聚糖Ⅰ（exopolysaccharideⅠ，EPSⅠ）是青枯雷尔氏菌的主要致病力因子（Orgambide *et al.*，1991）。在植株体内，青枯雷尔氏菌产生大量的 EPS I，EPS I 的释放可能会造成植株导管堵塞，或引起过高的静水力学压力，导致导管破裂，进而引起植株萎蔫（Saile *et al.*，1997）。Schell（2000）综述了青枯雷尔氏菌致病性基因调控的研究，指出致病过程至少受到 22 个以上基因的调控作用，形成复杂的致病性网络控制系统。然而，国内外文献未见生防菌对青枯雷尔氏菌致弱作用的报道。

生防菌使野生型青枯雷尔氏菌致弱机理可以从微生态选择和生理生化选择来理解。李宝聚等（2002）对瓜枝孢弱毒菌株致弱机理的研究表明，强致病菌株产生的纤维素酶和果胶酶活性显著高于弱毒菌株，形成生理生化上的差异。在微生态选择中，可能由于野生型青枯雷尔氏菌菌落中不同致病性个体对生防菌的敏感性差异，强致病力菌株个体的生长得到抑制，无致病力菌株个体的生长受到发挥，表现出菌株的致弱现象。在生理生化选择中，由于生防菌的处理，野生型青枯雷尔氏菌菌落中不同致病性个体生理生化

特性发生变化，使之丧失致病性，表现出致弱现象。关于生防菌对青枯雷尔氏菌微生态和生理生化选择的致弱作用，其致弱机理有待于作进一步研究。

第二节 芽胞杆菌杀虫毒素生物耦合机理

一、概述

农作物生长过程受到许多害虫的危害，农药的使用仍然是防治害虫的重要手段（刘波和冒乃和，2003）。在害虫防治过程中，致死浓度的农药施用，使 95%以上的害虫得到控制；但由于害虫个体差异，对农药敏感的害虫被杀死，对农药具有耐受能力的害虫生存下来，产生了对农药的适应性。害虫对农药的适应性导致害虫对农药的抗药性。农药的施用相当于人为地对害虫种群施加一种环境选择压力，不断地选择那些抗药性强的害虫，于是随着农药施用次数的增加，害虫对农药的抗药性不断加强（刘波等，2000a）。据报道，小菜蛾（*Plutella xylostella*）对氯氢菊酯的抗性达 100 倍（Shelton *et al.*，2009），对阿维菌素的抗性达 40 倍（Iqbal and Wright，1997），美国康奈尔大学学者用 Bt-*Cry1*C 转基因花菜饲养小菜蛾，26 代后对 Bt-*Cry1*C 转基因花菜的抗性达 12 400 倍（Zhao *et al.*，2001）。

1980 年，研究报道有 428 种节肢动物对一种或一种以上杀虫剂或杀螨剂有抗药性，其中 60%以上与农业活动密切相关。在农作物的植物病原体中，已知 150 种对农药有抗药性。估计有 50 种杂草对除草剂有抗药性。具抗药性的 428 种节肢动物中，仅有 20 种具有经济利用价值，因而节肢动物抗药性不仅危害农业生产，而且影响生态平衡。随着新的杀虫剂使用量不断增加和使用范围不断扩大，越来越多的害虫对农药产生了抗药性。1938 年，研究报道杀虫剂抗药性的案例数目为 7 种，1948 年为 14 种，1956 年为 69 种，1970 年为 224 种，1976 年为 364 种，1980 年为 428 种，1984 年为 447 种，20 世纪七八十年代害虫抗药性增长最快（张国洲，2002）。

以上数据说明在世界范围内害虫对杀虫剂产生抗药性的严重性。当新的农药，特别是杀虫剂被发现、被使用时，害虫就会产生新的抗药性，针对同样规模虫害则必须增大农药用量。对于不同农药而言，加大到两倍用量才能达原有效果，所需的时间不同，时间越短表示害虫产生抗药性越快。依据使用新农药品种先后为序，表示出必须加大两倍用量才能达同样除虫效果所需的时间（表 7-8）。表 7-8 中数据说明，引进农药品种越晚、时间越短、害虫越容易产生抗药性。

表 7-8 两倍用量达同样效果所需的时间

杀虫剂种类	加大农药两倍用量平均所需的时间/年
滴滴涕/甲氧滴滴涕	6.3
林丹/狄氏剂	5.0
有机磷	4.0
氨基甲酸酯	2.5
合成除虫菊酯	2.0

害虫抗药性可分为单一抗性、多重抗性、交互抗性。单一抗性是指害虫对一种农药产生抗性，多重抗性是指害虫对多种农药产生抗性，交互抗性是指害虫因对某农药产生抗性而增强对另一种农药的抗性。例如，害虫对滴滴涕和拟除虫菊酯都产生抗药性，所以估计对广泛使用滴滴涕所产生的抗药性，同样也能使后来合成的拟除虫菊酯失效。这是因为许多害虫存在着抗性基因，对各类农药的抗性表达趋同，使害虫对一类或几类农药的交叉和多重抗药性现象越来越多，降低了农药的使用效率。

害虫抗药性由遗传因素、生态因素和操作因素决定。遗传因素对害虫抗药性的作用表现为代谢抗性和靶标抗性，前者作用于酯酶、谷胱甘肽 S-转移酶、P-450 基因等，后者作用于乙酰胆碱酯酶、钠通道、γ-氨基丁酸受体、氯离子通道等。生态因素对害虫抗药性的作用表现为害虫时空种群异质性，包括生态抵抗力、生态嗜好性、生态迁移力等。操作因素对害虫抗药性的作用表现为农药的施用方法、施用浓度、施用频次、施用品种等。3 种因素作用不当都能引起害虫抗性的发生（唐振华和吴士雄，2000）。

农药对害虫的作用可分为胃毒、触杀、内吸、熏蒸等类型，无论哪种类型，都是农药的有效成分作用于害虫的特定位点，如 Bt 的伴胞晶体作用于害虫中肠上皮细胞进而达杀虫效果。阿维菌素是十六元大环内酯衍生物，通过抑制 γ-氨基丁酸（GABA）受体，从而使神经传导受阻来达杀虫效果。害虫对农药的抗药性就是克服农药位点作用，使之失效、钝化（刘波等，2000a）。

害虫抗药性的克服实质上是使农药作用位点保持足够的敏感性。在实际应用中，农药轮换施用、农药混配施用、增加农药对害虫的接触面积、培育害虫的敏感品系、增加生态多样性以增加害虫的多样性等，都是保持农药作用位点敏感性，减缓害虫抗药性的有效方法（刘波等，2000a）。

每一种农药对害虫都有一个主要作用位点，每一种害虫都存在多个农药作用位点。目前农药大多数为单剂，即单一的作用位点，害虫在生长过程中对单一作用位点的克服比多个作用位点容易。理论上讲，如果害虫对单一农药（一个位点）产生抗性的时间为 5 年，那么害虫对两个作用位点的复合农药产生抗性的时间为 25 年。农药复合对于延缓害虫的抗药性具有重要意义。两个以上作用位点的农药称为多位点杀虫毒素，多位点杀虫毒素的研究是克服害虫抗药性的有效途径。形成多位点杀虫毒素的方法有化合（synthesis）、藕合（conjugation）、混合（mixture）（刘波等，2000a）。化合是指两种物质生成一种物质的过程，产生了不同于参与物的新物质特性，使得作用位点发生变化。例如，在高效高毒化合物 *N*-甲基氨基甲酸酯的 N 原子上引入含硫基团，产生丁硫克百威等，结果既保留了母体化合物对害虫高效的特点，又降低了对哺乳动物的毒性。藕合是两种物质通过介质结合，生成一种新的物质联合体的过程，同时保持着参与物各自固有的特性，产生多个作用位点。藕合技术包括物理藕合（physical conjugation）和化学藕合（chemical conjugation），利用物理介质（如轻质碳酸钙）的带电荷等物理特性吸附毒素，定义为物理藕合（Kostarelos *et al.*，1998）。作者用该技术设计的物理藕合装置获国家专利（ZL 99-2-49448.6），研究的产品——多位点物理藕合生物杀虫剂申请了国家专利，实审公开号为 CN 1293899.A。以化学介质，如偶联剂 EDC(1-乙基-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺）将毒素连接，定义为化学藕合（Hermanson，1996），作者对化学藕

合技术申报了国家专利，已发表论文 5 篇。利用藕合技术进行苏云金芽胞杆菌（Bt）和阿维菌素的藕合，能极大地提高杀虫效果（Sengonca and Liu，2002； Liu and Sengoca，2002，2003a；刘波等，2000a）。混合是化学性质相似、物理性质相近的两种物质的简单复合，不改变参与物的理化性质，提供多个作用位点，提高杀虫效果，如大多数农药的复配。混合与物理藕合的差异在于，前者要求参与物的化学性质相似和物理性质相近，后者仅利用参与物的物理电荷特性，不要求剂型相同、pH 相似等特性。

生物农药具有生物活性高、选择性强和残留少等优点，正逐步补充和替代化学农药的使用（刘波等，2000a；刘波和冒乃和，2003）。不同类型的生物农药通过对害虫不同位点的作用而达杀虫效果，如 Bt 通过伴胞晶体毒素作用于害虫中肠上皮细胞致死害虫，而放线菌（*Streptomyces avermitilis*）毒素阿维菌素通过抑制 γ-氨基丁酸受体使害虫神经传导受阻（张国洲，2002）。但是，Bt 存在杀虫谱窄和杀虫速率慢两大弱点（唐振华和吴士雄，2000；Sengonca and Liu，2002），而阿维菌素则毒性较强、害虫易产生抗药性（Liu and Sengonca，2002）。近年来，多位点生物杀虫毒素理论的提出和生物藕合技术（bioconjugate technique）的应用为开发杀虫速率快、杀虫谱广、毒性低、害虫抗药性产生慢的新生物农药提供了新思路、新方法和新手段（Sengonca and Liu，2001a；Liu and Sengonca，2003）。害虫对生物农药产生抗药性的机理是克服了生物农药的位点作用，使之失效、钝化，因此害虫在生长过程中对多个位点作用的克服比对单一位点作用的克服要困难（刘波等，2000a）；具两个以上作用位点的生物农药（杀虫剂）称为多位点生物杀虫毒素（Liu and Sengonca，2003a）。生物藕合是通过偶联剂将两种或者两种以上的生物活性物质进行结合，生成一种新的生物藕合物的过程，产生的藕合物保持着原生物活性物质各自固有的特性（刘波等，2000a）。生物藕合技术是生物大分子藕合和修饰的重要技术，在环境净化、特定细胞组分的检测和定位、免疫研究等方面有着广阔的应用前景（刘波等，2000a）。

二、研究方法

关于多位点生物杀虫毒素 BtA 的研究有过许多的报道（唐振华和吴士雄，2000；Sengonca and Liu，2002； Liu and Sengonca，2002，2003a；刘波等，2000a），它是基于多位点生物杀虫毒素的理论和生物藕合技术，对两种生物毒素——Bt 晶体原毒素和阿维菌素进行结构修饰，然后再通过氨基-羧基偶联剂 EDC，实现生物藕合，生成新的具有多个作用位点的生物藕合物——BtA（刘波等，2000a）。研究组在以往的试验中已经证实了生物藕合产物与反应底物在紫外分光特性、杀虫谱、杀虫速率与引起小菜蛾死亡症状上存在着显著的差异（刘波等，2000a；Liu and Sengonca，2003），研究表明 BtA 对小菜蛾的致死率达 93%，高于 Bt 晶体原毒素和阿维菌素等当量单独作用和复配作用。本试验的目的是利用高效液相色谱（HPLC）分析多位点杀虫毒素 BtA 的形成，进一步确认多位点生物杀虫毒素 BtA 的色谱特性，以期为随后的结构分析、理化性质的分析和形成条件的优化打下基础。研究主要内容包括：检测不同反应时间的 BtA 生物藕合体系以确定生物藕合反应的特征；进行 BtA 生物藕合体系各反应底物两两组合的分析比较，识别生物藕合产物 BtA；对生物藕合产物 BtA 进行定性试验。现将研究结果报道如下。

（1）多位点杀虫毒素 BtA 的藕合原理

多位点生物杀虫剂 BtA 的研究基于多位点杀虫毒素的理论，将 Bt 的杀虫毒素进行酶切改造，形成带末端氨基的原毒素，将阿维菌素上的羟基进行激活、衍生化，形成带羧基的杀虫毒素衍生物，最后利用氨基-羧基偶联剂（EDC）进行藕合，实现两种生物毒素的结构改造和生化结合（图 7-5），解决了生物农药杀虫谱窄和杀虫速率慢的弱点。从 BtA 杀死的小菜蛾死亡症状上看，伴胞晶体和原毒素使小菜蛾的死亡症状表现为黑色，阿维菌素及其衍生物使小菜蛾的死亡症状表现为黄色，BtA 化学藕合物使小菜蛾的死亡症状表现为头部黑色，腹部黄色（图 7-6）。

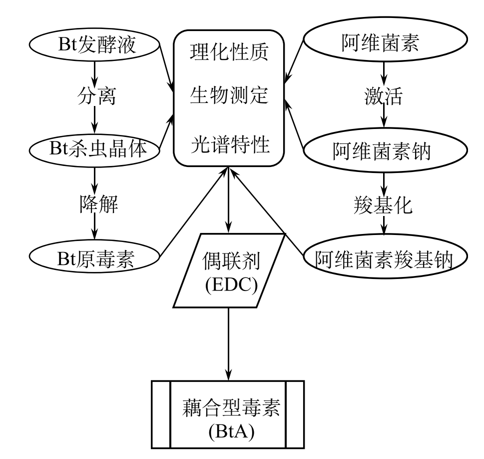


图 7-5　BtA 藕合策略

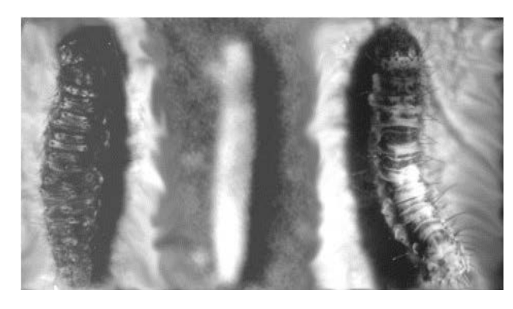


图 7-6　小菜蛾死亡症状比较

（2）供试材料

Bt 菌株 LSZ-9408 由福建省农业科学院农业生物资源研究所农业微生物研究中心从土壤中分离和保存。Bt 晶体的提纯采用双相分离法，Bt 发酵液∶1% Na_2SO_4∶CCl_4=7∶6∶7（体积比），晶体纯度>95%。晶体降解使用二硫代苏糖醇（dithiothreitol，DTT），分子质量为 154.2Da），美国化学文摘登记号（CAS 号）为 27565-41-9，北京华美生物工程公司进口分装。阿维菌素原粉（分子质量 871.8）由浙江德清拜克生物有限公司生产，其中 B_{1a}（$C_{48}H_{72}O_{14}$，分子质量为 873.1Da）含量为 90%，B_{1b}（$C_{47}H_{70}O_{14}$，分子质量 860.1 Da）含量为 10%。阿维菌素的激活使用氢化钠（NaH，分子质量为 24.0Da），CAS 为 7646-69-7。阿维菌素的羧基化衍生使用丁二酸酐［butyric anhydride，（$CH_3CH_2CH_2CO$）$_2O$，分子质量为 158.20Da］，CAS 为 106-31-0。偶联剂为零键桥偶联剂 EDC（分子质量为 191.7Da），CAS 为 25952-53-8。HPLC 为 HP1100（美国安捷伦公司生产），色谱柱为 C_{18}（4.0mm×250mm，内径 5μm），检测器为 VWD。色谱流动相采用上海化学试剂研究所生产的乙腈（色谱纯）。

（3）多位点生物杀虫毒素 BtA 的制备

Bt 晶体原毒素的制备：称取 1g Bt 晶体加入到 100ml 的 0.1mol/L Na_2CO_3-HCl 缓冲液（pH9.5）中，加入适量 DTT 使其最终浓度达 25mmol/L，37℃条件下温培 2h，4℃条件下 16 000r/min 离心 10min，上清液即为带末端氨基的 Bt 晶体原毒素。用 Lowry 法测

定最终蛋白质浓度，用蒸馏水调节蛋白质浓度至 10mg/ml，备用。阿维菌素的羧基化衍生物的制备：称取 2g 阿维菌素原粉溶解在 100ml 的甲苯中，加入 2g NaH，35℃下反应 1h，用滤纸滤去未反应的氢化钠（NaH）以终止激活反应，蒸馏滤液去除剩余的甲苯，以获得激活反应的产物——阿维菌素钠（abamectin-Na）。在阿维菌素钠中加入 1g 丁二酸酐，重新加入甲苯，调整反应溶液的最终体积为 100ml。在混合物中加入少量沸石，111℃条件下回流 2h，产生阿维菌素羧基钠（abamectin-COONa）。将反应混合物过滤，去除未反应物和沸石，蒸馏滤液以去除剩余的丙酮。将反应产物溶解在 100ml 的乙醇中，最终浓度为 20mg/ml，备用。

多位点生物杀虫毒素 BtA 的生物藕合：分别量取 10ml 制备的带末端氨基的 Bt 晶体原毒素溶液和 abamectin-COONa 溶液，均匀混合；加入 383.4mg 的氨基-羧基偶联剂 EDC，最终浓度为 0.1mol/L；生物藕合反应在 25℃条件下进行。称该反应体系为 BtA 生物藕合体系，形成的生物藕合物质称为多位点生物杀虫毒素 BtA（简称 BtA）。EDC 与阿维菌素羧基钠反应产生活性酯中间体（O-酰基异脲中间体），在 Bt 晶体原毒素（亲核剂）存在的情况下，活性酯与 Bt 晶体原毒素形成酰胺键，生成生物藕合产物 BtA，并释放一个异脲副产物（图 7-7）。

图 7-7　多位点生物杀虫毒素 BtA 的生物藕合

（4）多位点生物杀虫毒素 BtA 形成的 HPLC 分析

HPLC 色谱分析条件：进样量为 10μl，温度为 25℃，流动相 A 为纯水，流动相 B 为乙腈，流速为 1.0ml/min，洗脱条件为 20%～80% B/0-20min，检测波长为 254nm。多位点生物杀虫毒素 BtA 色谱特性的确定：对 BtA 生物藕合体系每隔 24h 取样检测，分析生物藕合体系在不同反应时间的物质变化，以确定生物藕合反应的发生。分别以同期制备的、相同浓度的 3 种反应底物（Bt 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC）及底物两两组合（Bt 晶体原毒素+abamectin-COONa、Bt 晶体原毒素+EDC 和 abamectin- COONa+EDC）

的 3 组物质作为对照，于相同的时间取样进行 HPLC 检测，分析差异，确定各反应底物和生物藕合产物的特征色谱峰。多位点生物杀虫毒素 BtA 的定性分析为进一步确定生物藕合物质 BtA 的特征峰，在反应 48h 的 BtA 生物藕合体系中取 1ml 样品，取样 4 次，一份备测，其余 3 份分别加入 1ml Bt 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC，而后立即进行 HPLC 检测，观察色谱峰的变化，进行定性分析。

三、芽胞杆菌生物毒素 BtA 藕合物的检测

Bt 伴胞晶体的降解物——原毒素，在 280nm 波长处有一吸收峰（图 7-8A）。这一毒素作为 BtA 藕合的毒蛋白材料。阿维菌素在 245nm 波长处有一吸收峰，为其特征峰（图 7-8B）。阿维菌素加入 NaH 激活后，在 354～600nm 波长出现吸收峰。激活后的阿维菌素进一步加入丁二酸酐进行衍生化反应形成的阿维菌素衍生物，在 354～600nm 波长有较大的变化（图 7-8C）。在阿维菌素激活和衍生化反应过程中，阿维菌素的特征峰基本保持不变，保证了阿维菌素的生物活性。将伴胞晶体处理后的原毒素、阿维菌素衍生物和碳化二亚胺类偶联剂 EDC 进行藕合反应，生成 BtA 藕合物，在 345～600nm 波长，吸收峰发生了较大的变化，阿维菌素的特征峰基本不变，形成了左边为阿维菌素特征峰，右边为原毒素藕合峰的 BtA 藕合物的波形特征（图 7-8）。液相色谱检测表明，原毒素靠左，BtA 居中，阿维菌素靠右（图 7-9）。

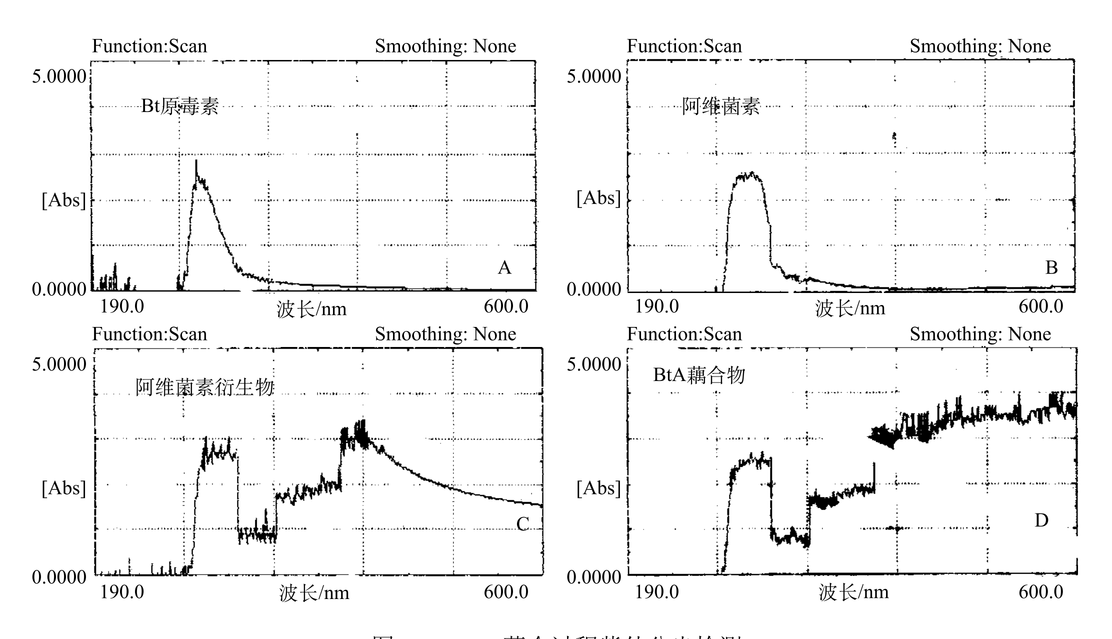


图 7-8　BtA 藕合过程紫外分光检测

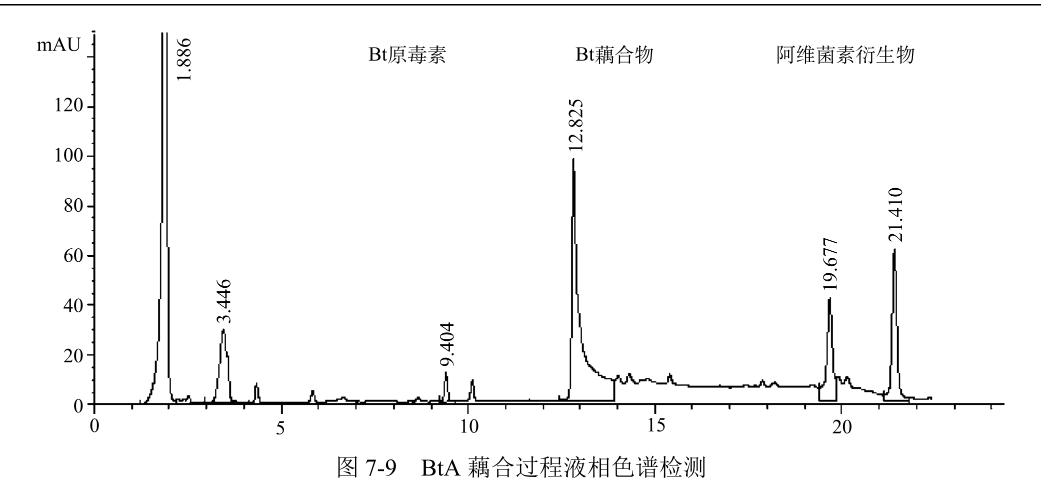


图 7-9　BtA 藕合过程液相色谱检测

四、芽胞杆菌生物毒素藕合过程的物质变化

实验结果表明在 24h 以后，BtA 生物藕合体系发生了反应，在峰 1 和峰 4 位置上有反应产物的形成，产物的量随着反应时间的延长而增加（图 7-10）。Bt 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC 混合后（0h）立即进行 HPLC 检测，BtA 生物藕合体系检测到 5 个峰（图 7-10A）；25℃条件下反应 24h 后，BtA 生物藕合体系检测到 6 个峰（从左到右定名为峰 1 到峰 6，下同），与 0h 相比，在保留时间 2min 左右新出现了峰 1（图 7-10B）。随反应时间的延长，峰 1 和峰 4 的高度不断升高，峰 2 和峰 3 的高度不断下降，峰 5 和峰 6 的高度变化不大（图 7-10C，图 7-10D）。峰 1 的峰高由 24h 的 189.9mAU 增加到 120h 的 1873.1mAU，峰 4 的峰高由 0h 的 15.3mAU 增加到 120h 的 97.5mAU，表明在峰 1 和峰 4 位置上有反应产物的形成，物质量在不断地增加。峰 2 和峰 3 的峰高分别由 0h 的 106.1mAU 和 72.6mAU 下降至 120h 的 29.5mAU 和 11.7mAU，表明有物质消耗。

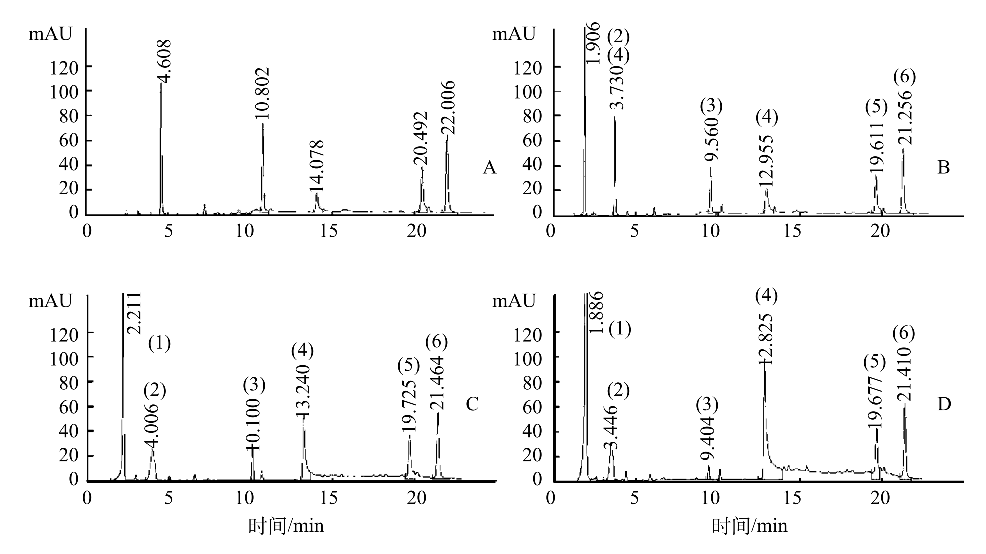


图 7-10　BtA 生物藕合反应体系在不同反应时间的液相色谱图

A.反应试剂 0h；B.反应时间 24h；C.反应时间 48h；D.反应时间 120h

五、芽胞杆菌生物毒素藕合过程反应底物的变化

实验结果表明，BtA 生物藕合体系在峰 1 和峰 4 位置出现的反应产物与反应底物之间存在着显著的差异（图 7-11）。反应 120h 的 BtA 生物藕合体系与各反应底物 Bt 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC 的 HPLC 检测结果比较，可以看出：Bt 晶体原毒素有 3 个色谱峰，其保留时间为 4～12min（预备试验表明在 15min 后不再出现新峰）（图 7-11A）；abamectin-COONa 有 3 个峰，其保留时间为 12～23min（图 7-11B）；溶于乙腈的饱和 EDC 只有一个峰，保留时间为 13.856min，和 abamectin-COONa 色谱峰 1 接近，峰高仅为 23.1mAU（图 7-11C）。

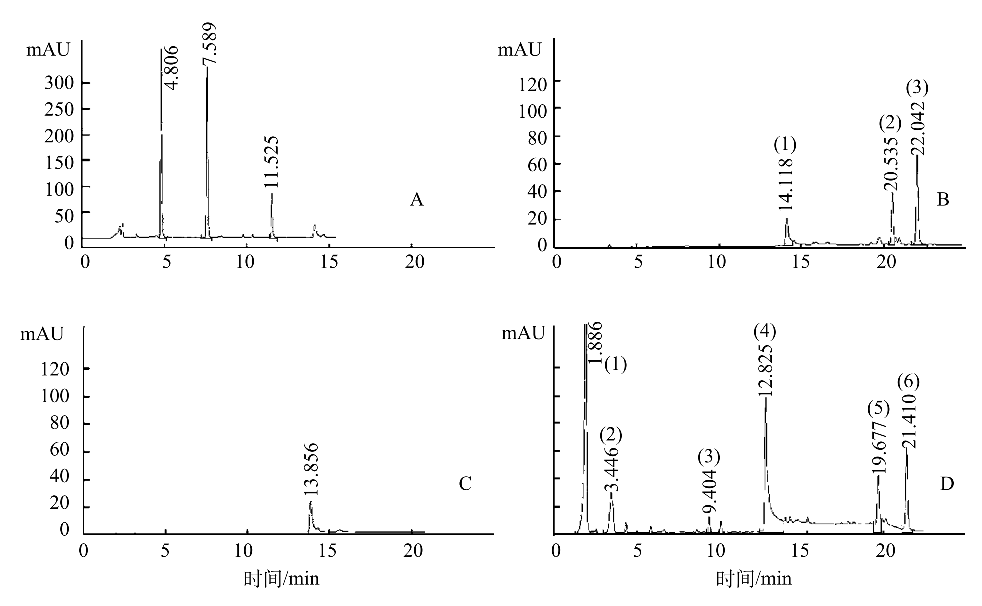


图 7-11　BtA 生物藕合体系与各反应底物的液相色谱图

A.Bt 原毒素；B.阿维菌素羧酸钠；C.偶联剂 EDC；D.BtA 生物藕合体系

在 BtA 生物藕合体系中检测到 6 个峰，保留时间分别为 1.886min（峰 1）、3.446min（峰 2）、9.404min（峰 3）、12.825min（峰 4）、19.677min（峰 5）和 21.410min（峰 6），峰高分别为 1873.1mAU、29.5mAU、11.7mAU、97.5mAU、41.5mAU 和 61.1mAU，其中，峰 1 为新峰，是 3 种反应底物皆不具有的峰。在 BtA 生物藕合体系色谱图中，Bt 晶体原毒素的相应色谱峰的 3 个峰值分别降低了 91.92%、99.5%和 86.52%；峰 4 处在 abamectin-COONa 色谱的峰 1 与 EDC 色谱峰的相应位置上，但其峰高上升到 97.5mAU；峰 5 和峰 6 处于 abamectin-COONa 色谱的峰 2 和峰 3 的相应位置上，峰高有轻微的下降（图 7-11D）。结果表明：与 3 种反应底物相比，BtA 生物藕合体系色谱的峰 1 为新峰，峰 4 物质的保留时间与 abamectin- COONa 色谱的峰 1 和 EDC 色谱峰的保留时间接近，但峰高比后两者的峰高总和 47.9mAU 还大 49.6mAU，峰 1 和峰 4 的变化表明有生物藕合产物的形成；在 BtA 生物藕合体系色谱图中保留时间为 3～12min 的相应位置上，Bt

晶体原毒素的相应色谱峰值明显降低，表明 Bt 晶体原毒素被消耗。

六、芽胞杆菌生物毒素藕合过程反应底物组合的变化

BtA 生物藕合体系的色谱峰 1 和峰 4 的分析表明：在 BtA 生物藕合体系中有反应产物形成。由于 BtA 生物藕合有 3 种底物——Bt 晶体原毒素、abamectin-COONa 和 EDC，因此新出现的反应产物有可能同时存在着是由其中 2 种底物反应产生的物质，以及由 3 种底物同时反应形成的生物藕合产物；因此，有必要对 BtA 生物藕合体系与反应底物的两两组合进行比较分析。实验结果表明：在 BtA 生物藕合体系峰 4 位置上的变化与各反应底物两两组合后产生的结果有显著的差异（图 7-12)。

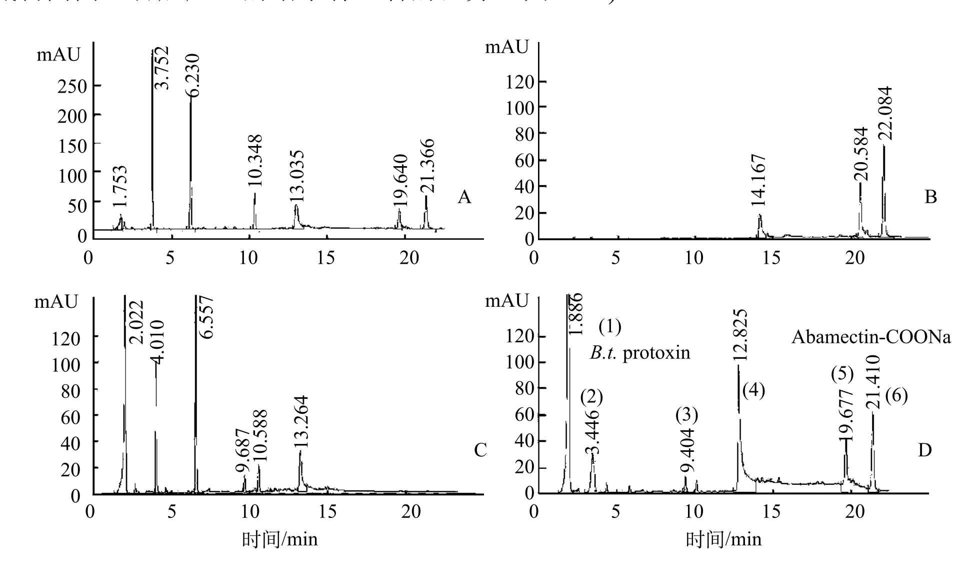


图 7-12　BtA 生物藕合体系与各反应底物组合的液相色谱图

A.Bt 原毒素与阿维菌素羧酸钠组合；B.阿维菌素羧酸钠与 EDC 组合；C.Bt 原毒素与 EDC 组合；D.BtA 生物藕合体系

反应 120h 后，Bt 晶体原毒素+abamectin-COONa 组合的色谱图显示：Bt 晶体原毒素和 abamectin-COONa 保持着原有的特征峰，表明在没有 EDC 参与反应的条件下，两者组合没有起反应(图 7-12-A)。abamectin-COONa+EDC 组合的色谱图与 Abamectin-COONa 的色谱图接近，说明 EDC 的色谱峰与 Abamectin-COONa 的峰 1 相重叠（图 7-12-B）。Bt 晶体原毒素+EDC 组合的色谱图中，出现 3 个大峰和 3 个小峰；与 Bt 晶体原毒素色谱图相比，保留了 Bt 晶体原毒素的特征峰，但出现了与 BtA 生物藕合体系色谱峰 1 相同的峰；对应于 BtA 生物藕合体系色谱峰 4 的位置上，出现了峰高为 31.3mAU 的小峰，但比 BtA 生物藕合体系的峰 4 低 66.2mAU（图 7-12C）。结果表明：与 3 种反应底物相比，BtA 生物藕合体系在峰 1 和峰 4 上呈现出差异，其中峰 1 的变化在 Bt 晶体原毒素+EDC 组合中检测到，3 种反应底物同时发生反应形成的生物藕合产物在 HPLC 检测中主要表现为峰 4 上的变化；因此，峰 4（保留时间约为 12.825min）是多位点生物杀虫毒素 BtA 的 HPLC 特征峰（图 7-12D）。

七、芽胞杆菌生物毒素的藕合产物 BtA 的定性分析

实验结果表明，在 3 组定性分析试验中，各色谱峰的变化存在显著的差异（图 7-13）。在反应 48h 的 BtA 生物藕合体系（图 7-13A）中，加入 Bt 晶体原毒素后，峰 2 的峰高迅速地由 31.9mAU 增加至 178.9mAU，其他峰的峰高未见明显增加（图 7-13B），表明峰 2 为 Bt 晶体原毒素的主要特征峰；在反应 48h 的 BtA 生物藕合体系中，加入 abamectin-COONa 后，峰 5 和峰 6 的峰高分别由 11.9mAU 和 18.2mAU 升高至 48.3mAU 和 81.2mAU，其他峰的峰高未见明显增加（图 7-13C），表明峰 5 和峰 6 为 abamectin-COONa 的主要特征峰；在反应 48h 的 BtA 生物藕合体系中，加入 EDC 后，峰 1 的峰高由 101.1mAU 增加到 211.7mAU，其他峰的峰高未见明显增加（图 7-13D），表明峰 1 为 EDC 的主要特征峰，这与前面所测的溶于乙腈的 EDC 色谱峰的保留时间有所不同，估计与 BtA 生物藕合体系有 Na_2CO_3-HCl 缓冲液有关。比较 BtA 生物藕合体系色谱图的 6 个峰和 3 组定性分析的色谱峰，BtA 生物藕合体系的峰 4 基本保持不变，可以进一步确定峰 4 为生物藕合的产物——多位点生物杀虫毒素 BtA 的特征峰。

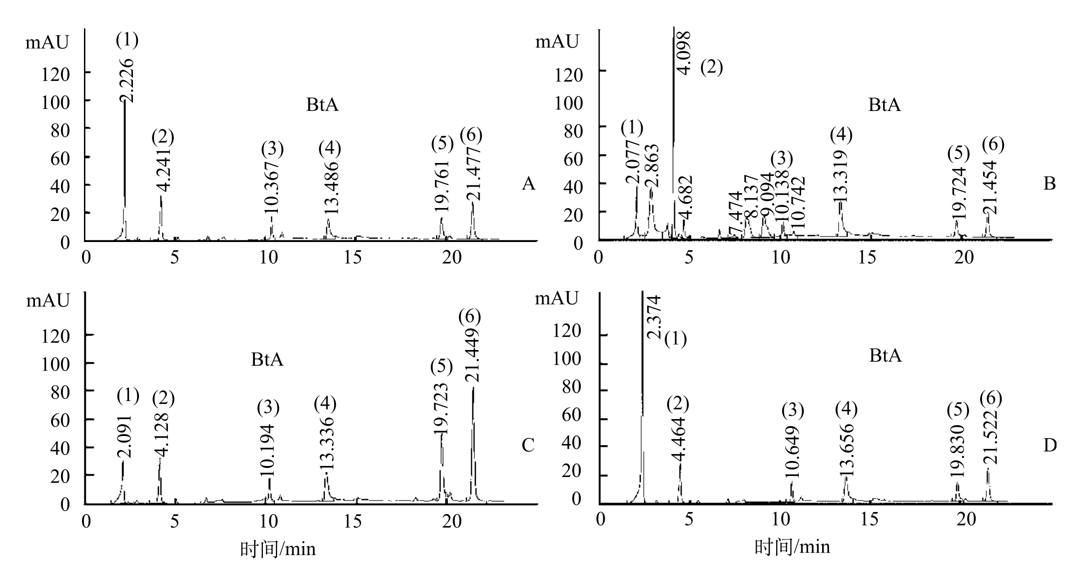


图 7-13　多位点生物杀虫毒素 BtA 的定性分析

A.BtA 生物藕合体系；B.BtA 生物藕合体系加入 Bt 原毒素；
C.BtA 生物藕合体系加入阿维菌素羧酸钠；D.BtA 生物藕合体系加入 EDC

八、芽胞杆菌生物毒素的藕合产物 BtA 杀虫速率的测定

伴胞晶体生物测定达 100%死亡率的时间为 48h，当降解成原毒素，较伴胞晶体缩短了 12h。用未经处理的阿维菌素生测达 100%死亡率的时间为 39h，经激活和衍生化为阿维菌素衍生物，死亡时间较阿维菌素缩短了 9h。BtA 化学藕合物生测达 100%死亡率的时间为 24h，较伴胞晶体缩短 24h，较阿维菌素缩短 15h。BtA 化学藕合物比伴胞晶体、原毒素、阿维菌素、阿维菌素衍生物的杀虫速度提高 6～24h（表 7-9）。

表 7-9　BtA 化学藕合过程阶段产物的生物测定

阶段产物	有效成分浓度/（mg/L）	供试虫数（*n*）	校正死亡率/%	死亡时间/h
伴胞晶体	20	90	100	48A
原毒素	20	90	100	36B
阿维菌素	10	90	100	39C
阿维菌素衍生物	10	90	100	30D
BtA 化学藕合物	5（阿维菌素） 10（原毒素）	90	100	24E
清水对照		90	0.00	#

注：　大写字母 A、B、C、D、E 表示极显著性差异（$P<0.01$）

九、芽胞杆菌生物毒素的藕合产物 BtA 杀虫谱的测定

Bt 的杀虫谱仅为鳞翅目害虫，阿维菌素和 BtA 可以防治鳞翅目、同翅目、鞘翅目害虫，但是 BtA 的杀虫速率高于阿维菌素（表 7-10）。

表 7-10　多位点生物杀虫毒素 BtA 扩大杀虫谱的测定

供试物	浓度/	小菜蛾		桃蚜		黄曲条跳甲	
	(ug a.i. /ml)	*n*	死亡率/%	*n*	死亡率/%	*n*	死亡率/%
伴胞晶体	5.0	90	48.33±4.23a	90	4.44±0.00 a	70	1.42±0.00a
阿维菌素	10.0	95	71.57±6.18b	95	82.11±6.26b	65	69.23±6.28b
BtA 藕合物	7.5	90	87.14±8.64c	80	93.75±7.94c	75	89.33±9.36c
清水对照	—	90	1.11±0.00d	90	3.33±0.00a	70	2.85±0.00a

注：　小写字母 a、b、c、d 表示显著性差异（$P<0.05$）

十、芽胞杆菌生物毒素的藕合产物 BtA 对天敌的毒性

BtA 对小菜蛾具有较高的毒力，对其捕食性天敌捕食螨、草间小黑蛛、花蝽、七星瓢虫毒力较低：对照农药对小菜蛾毒力低，对其捕食性天敌捕食螨、草间小黑蛛、花蝽、七星瓢虫毒力较高（表 7-11）。

表 7-11　BtA 和对照农药对小菜蛾及其捕食性天敌的毒力测定

处理	死亡率/%				
	小菜蛾	捕食螨	草间小黑蛛	花蝽	七星瓢虫
BtA	91.18 ± 2.03a	31.11 ± 1.82a	13.33 ± 0.89a	11.54 ± 1.12a	6.00 ± 1.22a
阿维菌素	78.00 ± 1.67b	72.94 ± 4.31b	46.51 ± 4.43b	22.00 ± 3.71b	15.55 ± 1.96b
联苯菊酯	75.57 ± 3.54b	55.55 ± 2.09c	55.10 ± 3.11c	16.00 ± 1.97c	19.64 ± 1.29c
敌敌畏	50.68 ± 1.98c	70.00 ± 4.21b	60.00 ± 2.35d	35.71 ± 3.12d	28.00 ± 2.05d
巴单	84.38 ± 4.75d	53.26 ± 3.18c	46.00 ± 2.07b	26.78 ± 2.27b	16.66 ± 1.27b
氯氰菊酯	63.75 ± 3.34e	98.85 ± 5.37d	73.68 ± 5.82e	81.03 ± 4.35e	41.79 ± 4.13e
清水对照	2.00	4.00	4.00	4.00	2.00

十一、讨论

Bt 伴胞晶体由二聚体亚单位多肽组成，多肽链中的半胱氨酸巯基大多都处在分子表面，可与相邻的亚单位形成二硫键，这些共价键在体外可由碱溶液（pH9.5 以上）或由昆虫肠液和二硫苏糖醇（DTT）等还原剂打开，使晶体解体形成带末端氨基的毒素蛋白，即 Bt 晶体原毒素（刘波等，2000a）。对阿维菌素进行结构修饰，可进一步提高其安全性和活性，降低毒性。最成功的例子是对阿维菌素 B_1 组分 C-22 和 C-23 位双键进行选择性地还原，形成伊维菌素（22, 23-二氢阿维菌素 B_1）；伊维菌素较阿维菌素具有更高的安全性，从而可进行大规模商业生产（刘波等，1998）。阿维菌素的改造使得其生物活性得到了极大的提高，该系列中最具活性的衍生物是 4′-外-甲氨基-4′-脱氧阿维菌素 B_1（阮传清等，2001）。对阿维菌素结构修饰主要包括羟基的修饰、螺缩酮的修饰、配基（内酯环）的修饰和六氢苯并呋喃环的修饰（廖联安等，2002）。研究中将阿维菌素的羟基进行激活、衍生化，形成带羧基阿维菌素衍生物。

EDC 是一种水溶性碳化二亚胺类化合物，普遍用于生物活性物质的藕合。它介导的是两种分子间直接的藕合，也就是说一种分子中的原子是被共价地附着于另一种分子的原子上，中间没有介入交联剂或间隔基，因此它又被称为零键桥偶联剂（刘波等，2000）。已被应用于蛋白质的链接（朱育菁等，2000）、免疫抗原的制备（刘波等，2000）、微粒表面的修饰和 ATP 酶的分析等。研究对 Bt 晶体进行还原改造，形成带末端氨基的 Bt 晶体原毒素；将阿维菌素的羟基进行激活、衍生化，形成阿维菌素羧酸钠；最后利用零键桥偶联剂 EDC 实现生物藕合（刘波等，2000a）。

Liu 和 Sengonca（2000）用紫外分光检测的结果表明：Bt 晶体原毒素在 280nm 有 1 个特征吸收峰；阿维菌素在 245nm 有一个特征吸收峰，经氢化钠（NaH）激活后在 354～600nm 出现吸收峰，进一步加入丁二酸酐衍生化形成的阿维菌素羧酸钠在 354～600nm 表现显著性的变化，但是在激活和衍生化反应过程中，阿维菌素的特征峰基本保持不变，保证了阿维菌素的生物活性；将原毒素和阿维菌素衍生物在偶联剂 EDC 的作用下进行生物藕合反应，生成生物藕合物 BtA，在 345～600nm 波长，吸收峰发生了较大的变化，阿维菌素的特征峰基本不变，形成了左边为阿维菌素特征峰，右边为原毒素藕合峰的 BtA 藕合物的特征波形。室内生物测定结果表明生物藕合产物——多位点生物杀虫毒素 BtA 对小菜蛾 3 龄幼虫的半致死时间 LT_{50} 为 35.27h，比 Bt 晶体原毒素和羧基化阿维菌素少 21.16h 和 10.14h；BtA 除了与 Bt 晶体一样对小菜蛾幼虫具有杀灭毒力外，还对桃蚜和黄曲条跳甲分别有 93.75%和 89.33%的防治效果（刘波等，2000a）。从 BtA 杀死的小菜蛾死亡症状上看，伴胞晶体和原毒素使小菜蛾的死亡症状表现为黑色，阿维菌素及其衍生物使小菜蛾的死亡症状表现为黄色，BtA 化学藕合物使小菜蛾的死亡症状表现为头部黑色，腹部黄色（Liu and Sengonca，2000）。与对照化学农药相比，BtA 对小菜蛾具有较高的毒力，对其捕食性天敌捕食螨、草间小黑蛛、花蝽和七星瓢虫毒力较低（朱育菁等，2000）。HPLC 检测结果证实了前人研究生物藕合产物 BtA 的紫外分光检测结果。生物藕合技术可成功地运用于多位点生物杀虫毒素的合成，而多位点生物杀虫毒素可提高生物农药的杀虫速率，扩大杀虫谱，在害虫抗药性的治理中起到重要的作用（刘波等，2004）。

生物藕合物 BtA 的 HPLC 色谱特征的成功测定，对于进一步研究 BtA 的形成条件、产物提纯、结构分析、理化性质奠定了基础，关于这方面将另文报道。

第三节　芽胞杆菌果品保鲜机理

一、概述

由采后病原菌引发的腐烂是果蔬采后腐烂的主要原因之一，造成了严重的经济损失（赵妍等，2007）。长期以来，使用化学杀菌剂是控制果蔬采后病害的主要方法，但是化学杀菌剂的使用由于容易引起病原菌的抗药性、影响食品的安全性和造成环境污染而越来越受到限制（钟敏等，2005）。对于果蔬采后保鲜的研究目前大都集中在寻找安全无毒和经济有效的方法上，其中，生物防治被认为是最具潜力的一种方法（张丽霞等，2009）。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 为本实验室从土壤中分离出的一株生防菌，该菌株的发酵液对龙眼果实腐生菌（车建美等，2010）、植物病原菌（葛慈斌等，2009；黄素芳等，2010）和动物病原菌（陈璐等，2009）均具有较好的抑制效果，同时短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 对不同品种龙眼具有较好的保鲜效果（车建美等，2010）。在本节中，作者主要通过抑菌活性的测定，观察从短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 中分离得到的主要功能成分——羟苯乙酯和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯是否对龙眼果实腐生菌具有抑菌效果，分析短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 对水果的保鲜机理。

龙眼果实采后在常温条件下 1d 内果皮就开始褐变，5～6d 果皮完全褐变(陈艺晖等，2010）。龙眼果皮褐变是果实采后发生的一种生理失调现象，龙眼果实采后果皮失水褐变过程中，超氧自由基（O_2^-）产生速率增加，过氧化物酶（POD）和多酚氧化酶（PPO）活性也增加。细胞的活性氧代谢失调、细胞膜结构及其区室化结构破坏，过氧化物酶 POD 和多酚氧化酶 PPO 与细胞内酚类物质接触发生酶促氧化并形成黑褐色高聚物，这些生理结构的变化有可能是龙眼果皮褐变的主要原因（林河通等，2007；车建美等，2010）。目前龙眼果实的主要贮藏技术包括：常温贮藏、低温贮藏、气调贮藏、热处理和辐照处理、施用化学保鲜剂等（陈艺晖等，2010）。这些贮藏技术大都是从控制龙眼果皮褐变入手，进而防止果实霉变腐烂。例如，熏硫处理可防止龙眼果皮 POD 活性的上升和总酚、类黄酮含量的下降，从而达防止龙眼果皮褐变和延缓衰老的效果（许秀淡等，1998）。采用气调保鲜并结合生物抑制剂处理，可以更好地抑制龙眼果皮的呼吸作用和酶活性变化，延缓果皮褐变，延长保鲜时间（王则金等，2004）。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液对龙眼果实具有很好的保鲜效果，经测定，喷施后的龙眼果皮 POD 和 PPO 活性下降（车建美等，2010），延缓果皮褐变衰老，其作用机理很有可能是因为短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 发酵液中的某些物质能够起到降低酶活性的作用。通过测定短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的主要功能成分对龙眼果皮 POD 活性的影响和对二苯代苦味酰基自由基（DPPH·）和羟自由基（·OH）的清除能力，研究其对果实的保鲜机理。芽胞杆菌生物保鲜机理研究方法如下。

二、研究方法

（1）短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生菌的抑制作用

试验菌株见表 7-12，龙眼腐生真菌和细菌为本实验室从龙眼腐烂果实的果皮和果肉分离得到的。细菌活化培养基为 NA 固体培养基，抑菌试验培养基为 NA 液体培养基；真菌活化培养基为 PDA 固体培养基，抑菌试验培养基为 PDA 液体培养基。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质为研究中分离浓缩的物质，主要活性成分邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯购自北京百灵威科技有限公司，羟苯乙酯购自 Sigma 公司。

表 7-12　供试菌株及来源

菌株编号	来源	菌株	采集地点
FJAT-3583	龙眼果皮	真菌	福建漳州
FJAT-3584	龙眼果皮	细菌	福建漳州
FJAT-7282	龙眼果肉	细菌	福建漳州
FJAT-7290	龙眼果肉	细菌	福建漳州

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质抑菌测定方法参照葛慈斌（2009）的文献。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要功能物质（EX）、羟苯乙酯（EP）和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯（mEHP）采用二甲基亚砜（DMSO）溶解，浓度为 100mg/ml，加样量为 100μl，以相同体积的 DMSO 溶剂为对照。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对腐生细菌的抑菌测定：将在 NA 培养基培养的细菌用接种环挑一环至装在 250ml 三角瓶中的 25ml NA 培养液中，30℃，160r/min，培养 24h。吸取培养液 1ml，加入到熔化并冷却到 50℃的 6ml 0.7%琼脂的 NA 培养基内，混合均匀后，作为上层培养基，倾覆在预先已凝固的 NA 平板上。待上层培养基凝固后，在每块平板上打孔，用移液器分别向每个孔中加入 100μl 提取物，然后将平板放置在 30℃培养箱培养。48h 后，观察抑菌圈直径大小。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对腐生真菌的抑菌测定：将在 PDA 平板上生长 5～7d 的真菌菌丝用接种针刮至 9ml 无菌水中，振荡均匀后静置，取上清液加入到熔化并冷却至 50℃的 6ml 0.7%琼脂的 PDA 培养基内，混合均匀后，作为上层培养基，倾覆在预先已凝固的 PDA 平板上。待上层培养基凝固后，在每块平板上打孔，用移液器分别向每个孔中加入 100μl 不同物质，然后将平板放置在 30℃培养箱中培养。48h 后，观察抑菌圈直径大小。

（2）短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质的抗氧化和抗褐变作用

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质为研究中分离浓缩的物质、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯均购自北京百灵威科技有限公司。乙酸、乙酸钠、苯酚、$FeSO_4$、水杨酸、H_2O_2、愈创木酚和 DMSO 为分析纯。二苯代苦味酰基自由基（DPPH·）和羟苯乙酯由 Sigma 公司生产。仪器：岛津 UV2550 分光光度计。

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果皮 POD 活性的影响。龙眼果皮

POD 粗酶液制备：取 1.0g 龙眼（品种为‘福眼’，采自泉州市农业科学研究所）果皮，剪碎，置入预冷的研钵中，加入 12ml 磷酸缓冲液（0.05mol/L，pH6.0）。匀浆后，4℃，13 000r/min 离心 30min，上清液为 POD 粗酶液。POD 反应液的配制：取磷酸缓冲液（0.05mol/L，pH6.0）50ml 于烧杯中，加入愈创木酚 28μl，磁力搅拌器加热搅拌使之完全溶解，冷却后加入 19μl 的 30% H_2O_2 混合，保存于冰箱中，备用。不同提取物的配制：短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要功能物质和不同标样[羟苯乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯、苯酚]采用 DMSO 稀释至不同的浓度梯度，用于测定其对 POD 活性的影响。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要功能物质成分对龙眼果皮 POD 活性的影响：采用愈创木酚法，参照史冬燕（2009）的方法，并略加改进。取 100μl 提取物溶液和 2.7ml POD 反应液于比色皿中，加入 200μl POD 粗酶液后迅速混匀，于 470nm 下开始读数，每 2s 读数一次，测定时间为 60s。计算吸光度值随时间的变化率 ΔA_0 以相应溶剂的变化率为对照，以不加提取物溶液的缓冲液调零，平行测 3 次，取其平均值，采用 Duncan’s 新复极差法进行方差分析。对 POD 活性的抑制率计算为：抑制率=（$\Delta A_0-\Delta A_1$）/ ΔA_0×100%，式中，ΔA_0 为加入相应溶剂后的变化率；ΔA_1 为加入提取物溶液后的变化率。

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对 DPPH·的清除作用。DPPH·溶液的配制：采用无水乙醇配制 DPPH·溶液，DPPH·浓度为 3mmol/L ，避光，现配先用。不同提取物的配制：短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要功能物质和不同标样[（羟苯乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯、苯酚）]采用 DMSO 稀释至不同的浓度梯度，用于测定其清除 DPPH·活性的能力。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对 DPPH·的清除作用：参照金杰等（2006）和付荣等（2004）的方法，并略加改进。将 1ml 乙酸-乙酸钠缓冲液（pH5.5）、1.87ml 的无水乙醇、0.03ml 提取物与 0.1ml 3mmol/L DPPH·溶液加入同一试管中，摇匀，25℃放置 25min 后，于 517nm 下测定吸光度，以相应溶剂作为参比，以不加 DPPH·和提取物的相同体系作为空白对照。每一吸光度平行测 3 次，取其平均值，采用 Duncan’s 新复极差法进行方差分析。清除率计算为：清除率=（A_0-A_1）/ A_0×100%，式中，A_0 为加入相应溶剂后的变化率；A_1 为加入提取物溶液后的变化率。

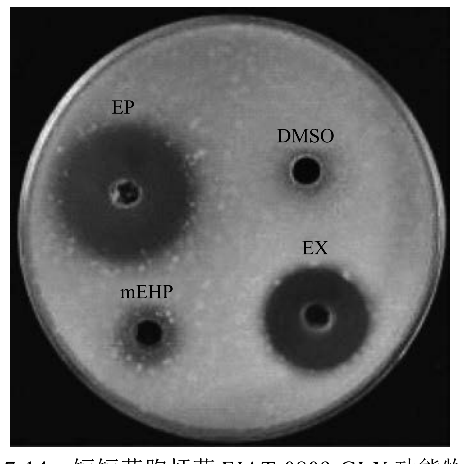
短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对羟自由基（·OH）的清除作用。不同提取物的配制：短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要功能物质和不同标样[（羟苯乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯、苯酚）]采用 DMSO 稀释至不同的浓度梯度，用于测定其对羟自由基（·OH）的清除能力。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对羟自由基（·OH）的清除作用：采用水杨酸法（曾军等，2009）测定样品溶液清除羟自由基的能力。在 10ml 的试管中依次加入 0.5ml $FeSO_4$ 溶液（5mmol/L）、5ml 不同浓度的样品溶液和 0.5ml H_2O_2（5mmol/L），摇匀，静置 10min 后，再加入 2ml 水杨酸溶液（10mmol/L），用水定容，摇匀，10min 后在 510nm 波长处以不加 H_2O_2 和样品溶液为参比测定吸光度。平行测定 3 次，采用 Duncan’s 新复极差法进行方差分析。计算不同物质对·OH 的清除率为：E=（1−（A_1-A_2）/A_0）×100%，式中，A_0 为未加样品溶液时的吸光度；A_1 为样品溶液的吸光度；A_2 为不加水杨酸时的吸光度。

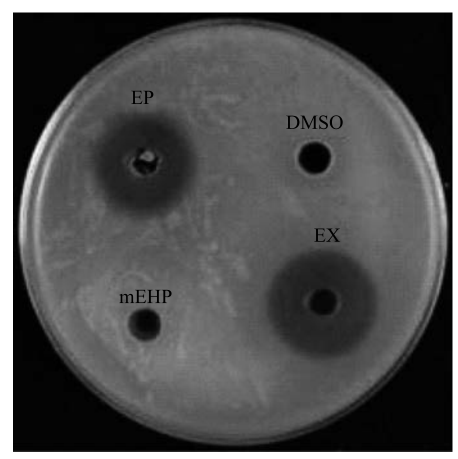
三、芽胞杆菌对龙眼果实腐生菌的抑制作用

短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实上分离的腐生真菌和细菌抑菌能力不同（表 7-13）。总体来说，羟苯乙酯对腐生真菌和细菌的抑菌能力最大，短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质次之，邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯的抑菌能力最小。羟苯乙酯和短短芽胞杆菌FJAT-0809-GLX功能物质对4种龙眼果实腐生真菌和细菌均具有抑菌作用，而邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯仅对菌株 FJAT-3583 和菌株 FJAT-3584 具有一定抑菌作用，抑菌圈直径分别为（17.09±0.76）mm 和（11.47±0.08）mm；羟苯乙酯对菌株 FJAT-3583、菌株 FJAT-3584 和菌株 FJAT-7282 的抑菌能力大于短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质，抑菌圈直径分别为（31.06±0.59）mm、（26.71±0.20）mm 和（22.02±0.34）mm。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对菌株 FJAT-7290 的抑菌能力大于羟苯乙酯，抑菌圈直径为（21.44±0.21）mm。在对龙眼果实保鲜过程中发现，采用短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 保鲜后的龙眼果实腐生菌较少（车建美等，2010），结合不同物质对龙眼果实腐生真菌和细菌实验结果来看，推测在其中起主要抑菌作用的为羟苯乙酯（图 7-14～图 7-17）。

表 7-13　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生菌的抑制作用

菌株编号	抑菌圈直径/mm		
	短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质	羟苯乙酯	邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯
FJAT-3583	13.33±0.43	31.06±0.59	17.09±0.76
FJAT-3584	21.08±0.14	26.71±0.20	11.47±0.08
FJAT-7282	17.82±0.42	22.02±0.34	0
FJAT-7290	21.44±0.21	18.41±0.24	0





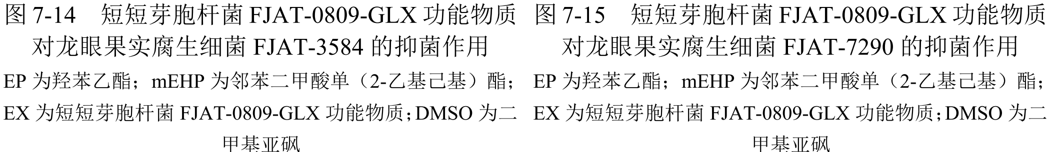


图 7-14　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生细菌 FJAT-3584 的抑菌作用

EP 为羟苯乙酯；mEHP 为邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯；EX 为短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质；DMSO 为二甲基亚砜

图 7-15　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生细菌 FJAT-7290 的抑菌作用

EP 为羟苯乙酯；mEHP 为邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯；EX 为短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质；DMSO 为二甲基亚砜

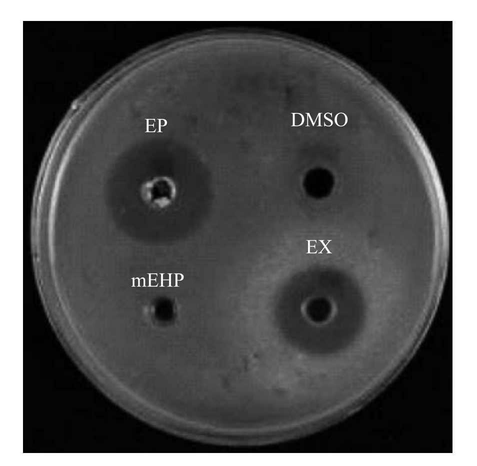


图 7-16　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生细菌 FJAT-7282 的抑菌作用

EP 为羟苯乙酯；mEHP 为邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯；EX 为短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质；DMSO 为二甲基亚砜

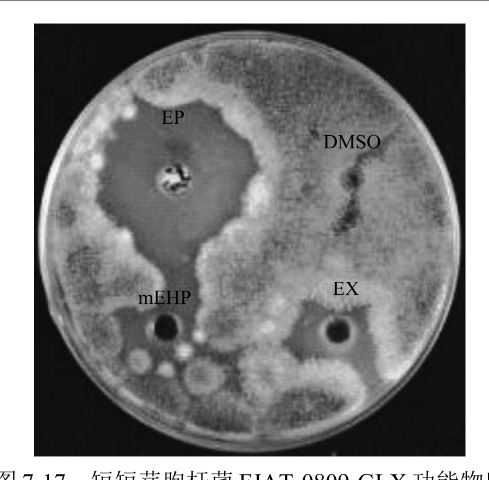


图 7-17　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生真菌 FJAT-3583 的抑菌作用

EP 为羟苯乙酯；mEHP 为邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯；EX 为短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质；DMSO 为二甲基亚砜

四、芽胞杆菌对 POD 活性的影响

短短芽胞杆菌对龙眼果皮 POD 活性影响，采用功能物质粗提物进行试验。随着短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度的递增，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率逐渐升高，差异显著（$P<0.05$），当短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 150mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最高，为 9.57%，当短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 125mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率次之，为 8.43%，当短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 93.75mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率有所降低，为 7.48%，当短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 31.25mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最低，为 1.187%（图 7-18）。

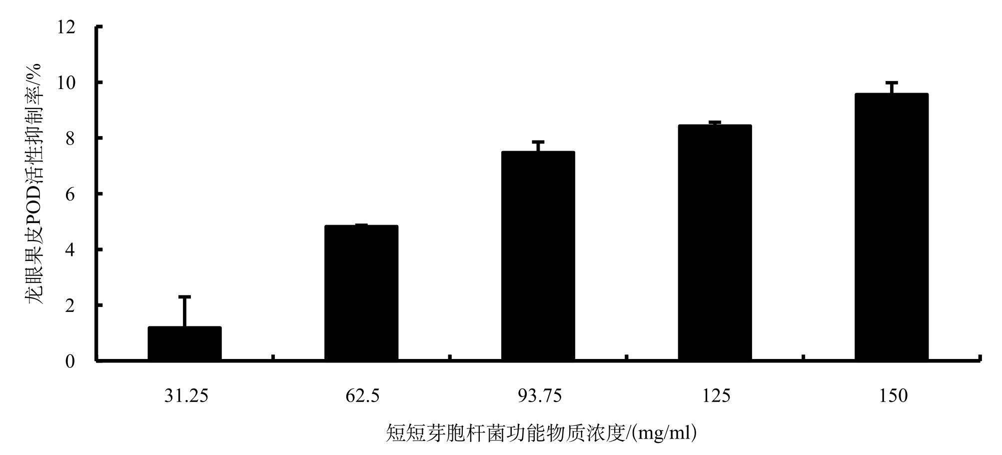


图 7-18　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对 POD 活性的影响

五、芽胞杆菌抑酶作用活性成分分析

在研究中，测定了短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质主要活性成分对龙眼果皮 POD 活性的影响，主要测定了目前可以购买到的主要成分，包括羟苯乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚、邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯和苯酚对龙眼果皮 POD 活性的影响，结果发现除了羟苯乙酯、苯酚和麦芽酚这 3 种物质对龙眼果皮 POD 活性具有一定的抑制作用外，其他物质均无抑制作用。

（1）羟苯乙酯对龙眼果皮 POD 活性的影响

随着羟苯乙酯浓度的递增，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率逐渐升高，差异显著（$P<0.05$）。当羟苯乙酯浓度为 50mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最高，为 25.69%；当羟苯乙酯浓度为 25mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率有所降低，为 13.64%；当羟苯乙酯浓度为 12.5mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率降低为 4.38%；当羟苯乙酯浓度为 6.25mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最低，为 0.53%（图 7-19）。

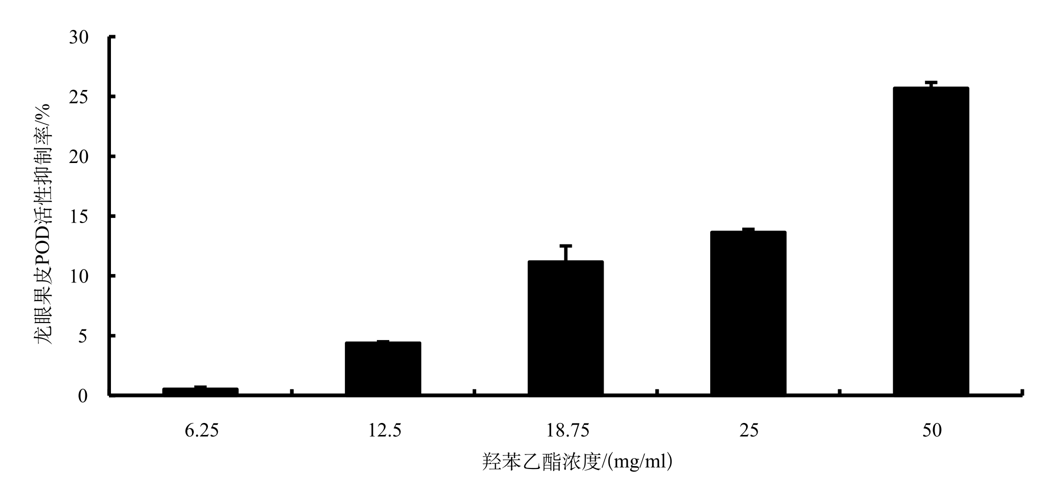


图 7-19　羟苯乙酯对龙眼果皮 POD 活性的影响

（2）苯酚对龙眼果皮 POD 活性的影响

随着苯酚浓度的递增，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率逐渐升高，差异显著（$P<0.05$）。当苯酚浓度为 500mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最高，为 40.0%；当苯酚浓度为 250mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率有所降低，为 23.32%；当苯酚浓度为 125mg/ml 时，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率降低为 14.36%；当苯酚浓度为 25mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最低，为 6.67%（图 7-20）。

（3）麦芽酚对龙眼果皮 POD 活性的影响

随着麦芽酚浓度的递增，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率逐渐升高，差异显著（$P<0.05$）。当麦芽酚浓度为 100mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最高，为 14.21%；麦芽酚浓度为 50mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率有所降低，为 8.44%；当麦芽

酚浓度降低为 12.5mg/ml 时，对龙眼果皮 POD 活性的抑制率最低，为 3.17%（图 7-21）。

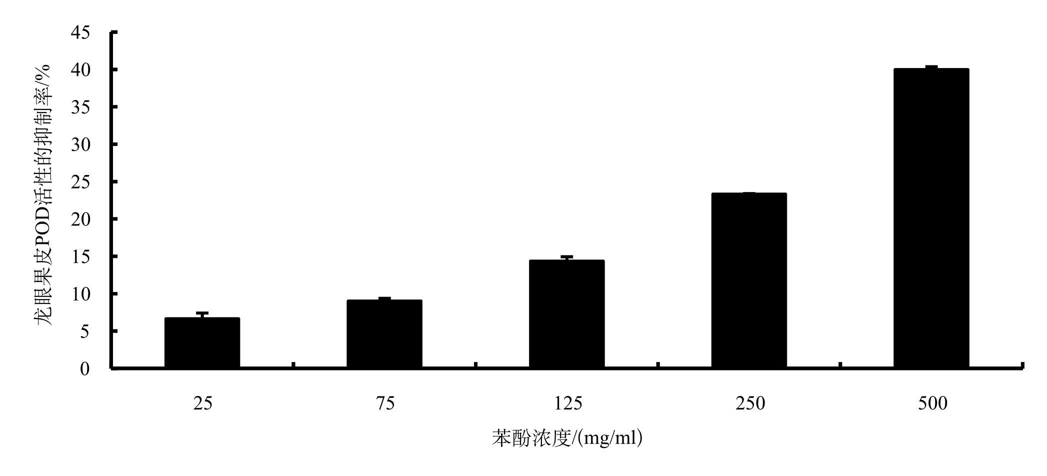


图 7-20　苯酚对龙眼果皮 POD 活性的影响

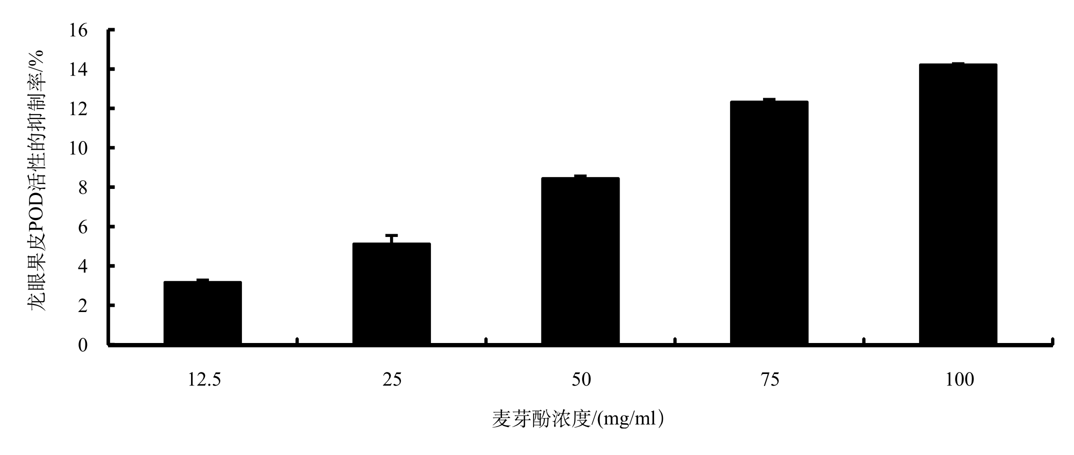


图 7-21　麦芽酚对龙眼果皮 POD 活性的影响

对短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要活性成分的检测表明，在相同浓度条件下（当浓度为 25mg/ml 时），羟苯乙酯对龙眼果皮 POD 活性的抑制率为 13.64%，苯酚对龙眼果皮 POD 活性的抑制率为 6.67%，麦芽酚对龙眼果皮 POD 活性的抑制率为 5.12%，羟苯乙酯对龙眼果皮 POD 酶活性抑制最强，推测羟苯乙酯是短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的主要抑酶物质。羟苯乙酯、麦芽酚和苯酚对 POD 活性的抑制能力与其浓度呈正相关。

六、芽胞杆菌对 DPPH·自由基的清除作用

不同浓度短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对 DPPH·均具有一定的清除作用，且随浓度的增加清除作用加强，表明在一定范围内短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质清除自由基的能力与其浓度呈明显的量效关系。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 100mg/ml 时，对 DPPH·的清除能力最强，清除率最高为 61.35%，浓度继续提高，会产生浑浊而无法测定。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 50mg/ml

时，对 DPPH·的清除能力有所下降，清除率为 41.77%；短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度为 6.25mg/ml 时，对 DPPH·的清除能力最低，清除率为 7.63%（图 7-22）。

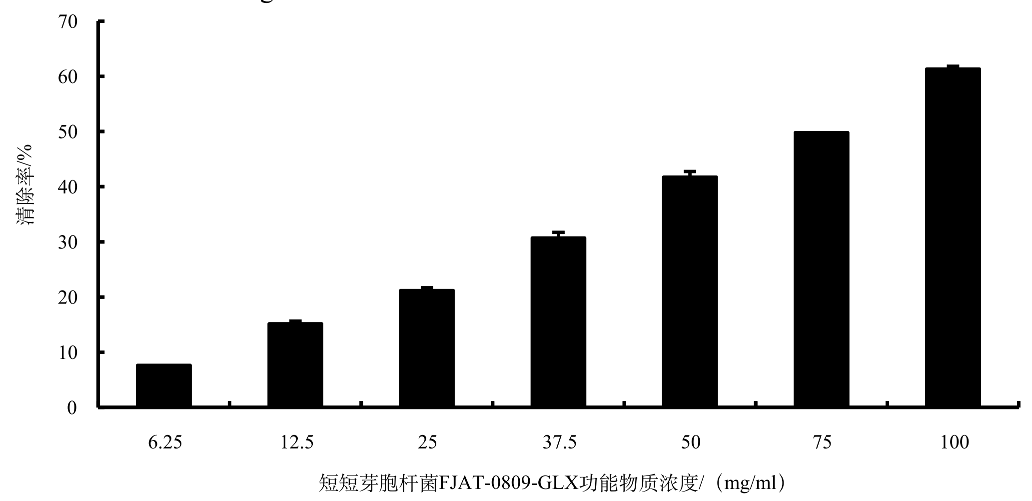


图 7-22　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对 DPPH·的清除作用

七、芽胞杆菌清除 DPPH 自由基活性成分分析

在研究中，作者测定了短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质主要活性成分对 DPPH·的清除作用，主要测定了目前可以购买到的主要活性成分，包括羟苯乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯和苯酚对 DPPH·的清除作用，结果发现除了麦芽酚对 DPPH·具有清除作用外，其他物质均无抑制作用。不同浓度麦芽酚对 DPPH·均具有一定的清除作用，且随浓度的增加清除作用加强，说明在一定范围内麦芽酚清除自由基的能力与其浓度呈明显的量效关系。麦芽酚浓度为 200mg/ml 时，对 DPPH·的清除能力最强，清除率最高为 68.35%；麦芽酚浓度为 50mg/ml 时，对 DPPH·的清除能力有所下降，清除率为 47.80%；麦芽酚浓度为 6.25mg/ml 时，对 DPPH·的清除能力最低，清除率为 19.29%（图 7-23）。

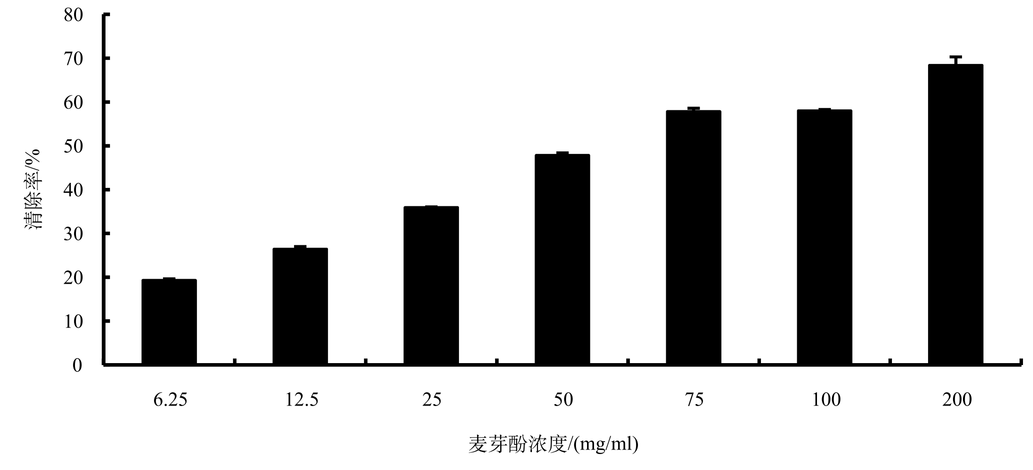


图 7-23　麦芽酚对 DPPH·的清除作用

八、芽胞杆菌对羟自由基的清除作用

不同浓度短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对羟自由基的清除率存在差异（$P<0.05$），其中以 7.5mg/ml 时的清除率最高，达 98.20%，5mg/ml 时的清除率次之，为 86.51%，当浓度为 1mg/ml 时，清除率仍然可以达 34.38%，短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 主要功能物质浓度为 0.1mg/ml 时，清除率最低，为 12.82%（图 7-24）。

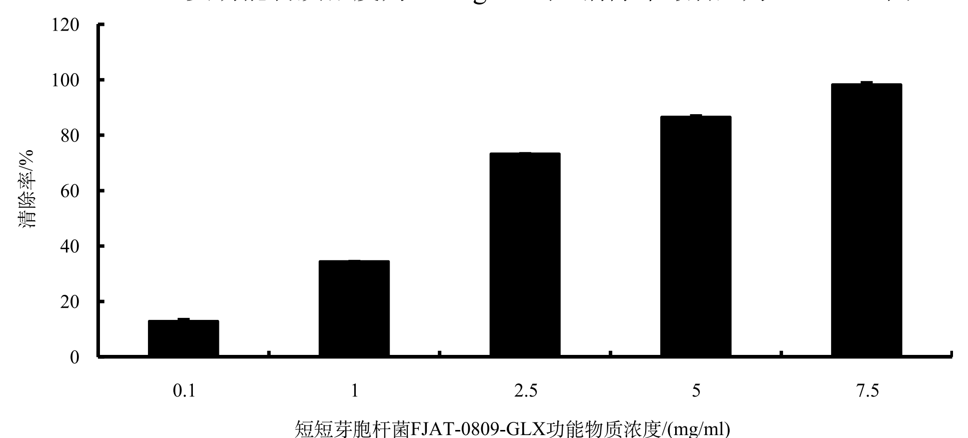


图 7-24　短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对羟自由基（·OH）的清除作用

九、芽胞杆菌清除羟自由基活性成分分析

在研究中，作者测定了短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质主要活性成分对羟自由基（·OH）的清除作用，主要测定了目前可以购买到的主要活性成分，包括羟苯乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异辛酯、麦芽酚和邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯和苯酚对羟自由基（·OH）的清除作用，结果发现除羟苯乙酯对羟自由基（·OH）具有清除作用外，其他物质或者因为容易产生沉淀而无法测定，或者无抑制作用。

不同浓度羟苯乙酯对羟自由基的清除率存在差异（$P<0.05$），以浓度为 150mg/ml 时的清除率最高，达 68.38%；当浓度为 40mg/ml 时，清除率有所下降，为 53.19%；当羟苯乙酯浓度为 8mg/ml 时，清除率仍然较高，为 34.09%；浓度为 1.25mg/ml 时，清除率最低，为 2.85%（图 7-25）。

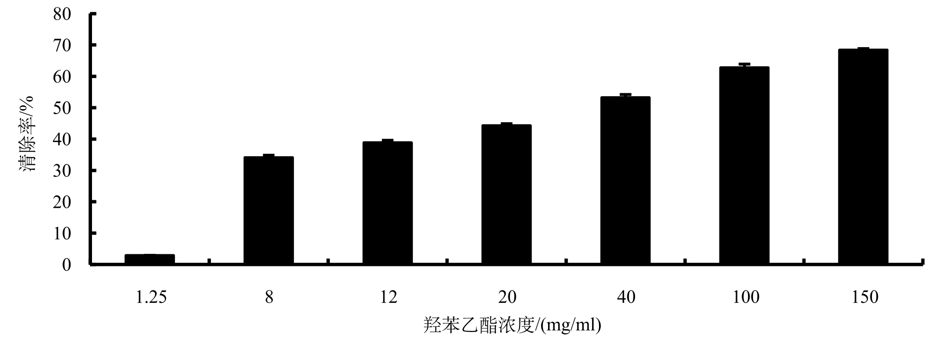


图 7-25　羟苯乙酯对羟自由基的清除作用

十、讨论

1）短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果实腐生菌的抑制作用。在对龙眼果实保鲜过程中，作者发现，采用短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 保鲜后的龙眼果实腐生菌较少（车建美等，2010）。通过对其主要成分的抑菌活性检测表明，羟苯乙酯（EP）对腐生真菌和细菌的抑菌能力最大，邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯（mEHP）的抑菌能力最小，推测在其中起主要抑菌作用的为羟苯乙酯。这与赵妍等（2007）和钟敏等（2005）的研究结果一致。赵妍等（2007）以枯草芽胞杆菌（*B. subtilis*）B10 作为拮抗菌，研究其对草莓采后病害菌的抑制作用。结果表明，该菌株的活菌液和菌悬液对草莓采后病害的抑制效果较好，并且贮藏温度越高越有利于拮抗菌对病原菌的抑制作用。钟敏等（2005）的研究表明，链霉菌 702 发酵液的乙醇浸提稀释 100 倍液与 10mg/L 纳他霉素能抑制不同水果有害菌的生长，从而达防腐保鲜效果。

2）短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质抑制 POD 活性在龙眼保鲜中的作用。在生物和非生物因素刺激下，活性氧成分的增加会加速植物的细胞氧化，从而破坏组织细胞（van Loon *et al.*，1998）。在植物体中有毒害作用的活性氧（activated oxygen species，AOS）可以被非酶物质（如 α-生育酚、β-胡萝卜素、酚类物质、抗坏血酸和谷胱甘肽等）和抗氧化酶（antioxidant enzymes）有效地去除（Noctor and Foyer，1998）。抗氧化酶系统包括可以催化 O_2^{-}形成 H_2O_2 的超氧化物歧化酶（superoxide dimutase，SOD）和去除 H_2O_2 毒性的过氧化物酶（guaiacol peroxidase，POD）及多酚氧化酶（polyphenol oxidase，PPO）等，这些酶以多种形式存在于植物组织中（Wojtaszek，1997）。龙眼果实 POD 以与细胞壁或细胞器相结合的形式存在，由于龙眼果实采后衰老等逆境胁迫，促进了细胞壁降解，破坏了果实膜系统的完整性，使得 POD 得以释放，导致 POD 活性升高（王则金等，2004）。作者研究发现，随着短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度的递增，其对龙眼果皮 POD 活性的抑制率逐渐升高，因而推测抑制龙眼 POD 酶活性是短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 保鲜龙眼果实的机理之一。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 抑制 POD 酶活性的机理与龙眼果实保鲜的物理方法作用机理相似，王则金等（2004）研究表明，低温结合生物抑制剂可以有效地降低龙眼果皮酶活性，从而达保鲜效果。对短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的 6 种主要活性成分的检测表明，当浓度为 25mg/ml 时，羟苯乙酯对龙眼果皮 POD 活性抑制率为 13.64%，苯酚对龙眼果皮 POD 活性抑制率为 6.67%，麦芽酚对龙眼果皮 POD 活性抑制率为 5.12%，羟苯乙酯对龙眼果皮 POD 酶活性抑制最强，推测羟苯乙酯是短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的主要抑酶物质，在龙眼果实保鲜中起主要作用。目前未见关于羟苯乙酯、苯酚和麦芽酚对龙眼果皮 POD 酶活性具有抑制作用的报道。

3）短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质的抗氧化作用在龙眼保鲜中的作用。二苯代苦味酰基自由基（DPPH·）在反应缓冲液中呈深紫色，最大吸收峰波长为 517nm，添加自由基清除剂后，颜色会相应减退，褪色程度与清除剂的清除能力及数量存在一定的定量关系，二苯代苦味酰基自由基（DPPH·）是一种很稳定的自由基，可用分光光度法进行定量分析，评价抗氧化物质的抗氧化能力（Choi *et al.*，2002；Rong and Foo，2000；Brand-williams *et al.*，1995）。金杰等（2006）采用甲醇、乙醇、丙酮和乙酸乙酯萃取了桑椹醋的提取物，并采用 DPPH 法测定了不同提取物的抗氧化活性，结果表明，甲醇、

乙醇、丙酮和乙酸乙酯提取物对 DPPH·均有较强的清除作用。吴良银等（2010）发现，青霉菌提取物的有效组分具有较强的清除 DPPH·和·OH 的能力，且清除作用与浓度呈正相关性。不同浓度短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对 DPPH·均具有一定的清除作用，且随浓度的增加清除作用加强，表明在一定范围内短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质清除自由基的能力与其浓度呈明显的量效关系，说明短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质具有一定的抗氧化能力，其中含有抗氧化物质。林河通等（2005）的研究表明，引起龙眼果皮褐变的原因之一是龙眼果皮的失水，龙眼果皮的失水可能导致龙眼果皮组织抗氧化能力下降，活性氧累积，细胞膜系统膜脂过氧化作用加强，导致细胞膜结构完整性破坏，延缓龙眼果皮组织抗氧化能力的下降可能是短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的保鲜机理之一。进一步对其主要活性成分的分析表明，在 6 种活性成分中，不同浓度麦芽酚对 DPPH·均具有一定的清除作用，且随浓度的增加清除作用加强，说明在一定范围内麦芽酚清除自由基的能力与其浓度呈明显的量效关系。表明短短芽胞杆菌 FJAT-0809- GLX 的主要抗氧化物质为麦芽酚。

4）短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质的羟自由基清除作用在龙眼保鲜中的作用。自由基（free radica1）又称游离基，由于带有不成对电子具有配对的趋向，极易发生得电子或失电子的反应，引发其他物质生成自由基，对大分子（蛋白质、碳水化合物、脂类物质和核酸等）产生一些不应有的修饰和损伤（冯涛等，2010）。冷害引起的果皮褐变是龙眼果实冷藏期间的主要生理病害。龙眼果实发生冷害时，积累的自由基得不到及时清除，造成自由基伤害，破坏了细胞膜结构，使膜透性增大，导致果皮褐变（陈艺晖等，2010）。随着短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质浓度的升高，其对羟自由基的清除率也升高，说明短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 可通过清除羟自由基防止自由基造成的伤害，延缓果皮的褐变进而防止腐烂。进一步对短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的 6 种主要活性成分的检测表明，在清除羟自由基作用中起主要作用的为羟苯乙酯。研究测定了短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的主要功能成分对龙眼果皮 POD 酶活性的影响及对二苯代苦味酰基自由基（DPPH·）和羟自由基（·OH）的清除能力，结果表明，短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质对龙眼果皮 POD 酶活性具有一定的抑制作用，对二苯代苦味酰基自由基（DPPH·）和羟自由基（·OH）的清除能力与短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 功能物质的浓度呈正相关性。短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 对 POD 活性的主要抑制物质包括羟苯乙酯、苯酚和麦芽酚，对 DPPH·清除作用的主要物质是麦芽酚，对·OH 清除作用的主要物质为羟苯乙酯，推测羟苯乙酯、苯酚和麦芽酚在短短芽胞杆菌 FJAT-0809-GLX 的保鲜效果中起关键作用，结合不同物质的相对含量测定，推测羟苯乙酯是其主要作用物质。

第四节　芽胞杆菌动物益生菌作用机理

一、芽胞杆菌对大肠杆菌拮抗菌的作用

1. 概述

益生菌（probiotic）是指在一定浓度范围内可促进动物健康的活性微生物制剂（Marianna et al.，2006），可通过动物消化道的竞争排斥作用抑制有害菌及有害物质，

进而改善消化道内环境，促进动物生长，提高动物机体免疫力(惠明等，2008；俞宁和申一淋，2009；赵达等，2008)。近年来，将益生菌作为抗生素的替代品及饲料添加剂运用于动物生产成为动物营养方向的又一个研究热点（郭小华和赵志丹，2010）。作为益生菌种的枯草芽胞杆菌具有较广的抗菌谱，对许多病原菌均有极强的抑制作用，同时还可产生多种酶类，包括蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶等，以提高消化酶活性而备受青睐（Himanen *et al.*，1993）。颜其贵等（2006，2007）利用 3 株芽胞杆菌分别对大肠杆菌和沙门氏菌进行了体外拮抗试验，结果表明芽胞杆菌对大肠杆菌及沙门氏菌均有一定的抑制效果。

本试验以前期筛选获得的 11 株芽胞杆菌为研究材料，开展了芽胞杆菌对致病性大肠杆菌和沙门氏菌体外拮抗作用。

2. 研究方法

供试菌株：11 株芽胞杆菌标准菌株（表 7-14）。指示菌：大肠杆菌菌株 K88。供试培养基包括 NA 培养基、TTC 培养基、SPA 培养基和 PDA 培养基。以配制硫酸链霉素 100U/ml 作为阳性对照。

表 7-14　供试菌株

序号	新编号	菌种原编号	菌种拉丁文名称	菌种中文名称
1	FJAT-8761	CCUG 7416	*B. circulans*	环状芽胞杆菌
2	FJAT-8763	CCUG 7417	*B. coagulans*	凝结芽胞杆菌
3	FJAT-8765	CCUG 28525	*B. flexus*	弯曲芽胞杆菌
4	FJAT-8770	CCUG 1816	*B. lentus*	缓慢芽胞杆菌
5	FJAT-8780	CCUG 26017	*B. schlegeli*	施氏芽胞杆菌
6	FJAT-8782	CCUG 27413	*B. smithii*	史氏芽胞杆菌
7	FJAT-8787	CCUG 7429	*B. thuringiensis*	苏云金芽胞杆菌
8	FJAT-8788	CCUG 50740	*B. velezensis*	贝莱斯芽胞杆菌
9	FJAT-10002	DSM 29	*P. alvei*	蜂房类芽胞杆菌
10	FJAT-10005	DSM 9205	*B. mojavensis*	
11	FJAT-10010	DSM 13796	*B. endophyticus*	内生芽胞杆菌

大肠杆菌菌液的制备：将大肠杆菌菌株 K88 划线于 NA 培养基上，置于 30℃条件下培养 48h。挑取大肠杆菌单菌落于装有 25ml LB 培养液的 250ml 三角瓶中，置于 30℃，170r/min 摇床培养 24h，筛选备用。划线法抑菌：首先将 NA 培养基在培养皿中倒入薄薄一层，吸取 LB 培养液中培养的大肠杆菌菌株 K88 或青枯雷尔氏菌 FJAT-91 悬液 1ml 于温度为 50℃左右的 100ml 0.7% NA 培养基中，混成菌悬液培养基，倒入已经有一层 NA 培养基的培养皿中静置，晾干。挑取待筛选拮抗菌株在倒有混合菌悬液的培养基上划一条短线，每平板可以划 4 个菌株，每菌株两个重复。抑菌率计算公式：抑菌率（%）=（对照菌落半径−处理菌落半径）/对照菌落半径×100。抑菌圈法抑菌参照葛慈斌等（2009）的文献。

3. 芽胞杆菌拮抗菌株的筛选

将分离活化的 11 株芽胞杆菌分别与病原菌指示菌进行拮抗筛选培养。从图 7-26 可以看出有部分芽胞杆菌对大肠杆菌菌株 K88 有明显的抑制作用，其中抑制效果较明显的菌株有芽胞杆菌 FJAT-8770 缓慢芽胞杆菌（*B. lentus*）、FJAT-8782 史氏芽胞杆菌（*B. smithii*）、FJAT-8787 苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*）、FJAT-8788 贝莱斯芽胞杆菌（*B. velezensis*）、FJAT-10002 蜂房类芽胞杆菌（*P. alvei*）、FJAT-10005 *B. mojavensis*。此外，FJAT-8763 凝结芽胞杆菌（*B. coagulans*）、FJAT-8765 弯曲芽胞杆菌（*B. flexus*）、FJAT-8780 施氏芽胞杆菌（*B. schlegelii*）、FJAT-10010 内生芽胞杆菌（*B. endophyticus*）也有一定抑菌效果。据初筛所得的芽胞杆菌进行的抑菌圈实验表明，有 7 种芽胞杆菌有明显的抑菌效果；其中 FJAT-8770 缓慢芽胞杆菌、FJAT-8788 贝莱斯芽胞杆菌、FJAT-10002 蜂房类芽胞杆菌、FJAT-10005 *B. mojavensis* 抑菌圈直径都在 15mm 以上，有较强的抑菌作用。FJAT-8761 环状芽胞杆菌、FJAT-8782 史氏芽胞杆菌、FJAT-8787 苏云金芽胞杆菌也有一定的抑菌作用。

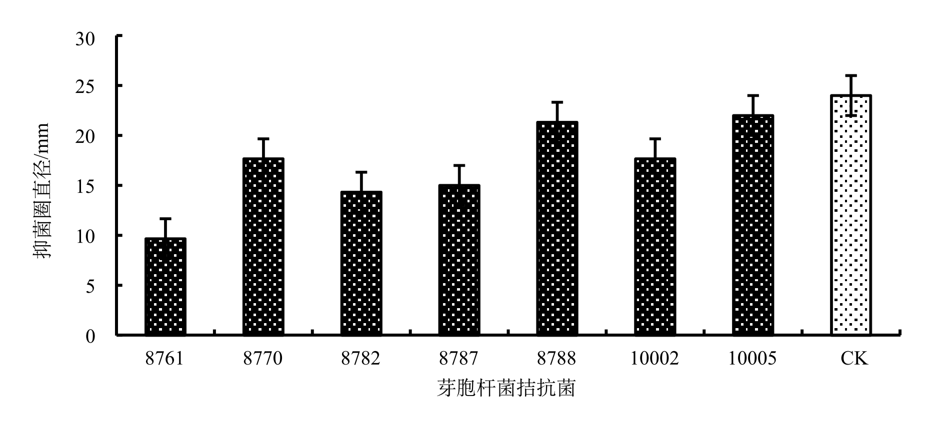


图 7-26　芽胞杆菌拮抗菌对大肠杆菌的抑菌活性

二、芽胞杆菌对大肠杆菌的对峙作用

供试菌株：靶标菌株为大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp。动物益生菌为短短芽胞杆菌益生菌 LPF#2（*B. brevis* LPF#2）和 BS-2000 菌株（*B. subtilis* BS-2000）。培养基：生防菌摇瓶培养用 B 培养基（成分为蔗糖 2.0%、牛肉浸膏 0.5%、蛋白胨 0.3%、可溶性淀粉 1.0%、酵母粉 0.5%、$CaCl_2$ 0.5%），靶标菌株用 LB 培养基；对峙培养试验用 NA 培养基。

活化培养好的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）菌株和 BS-2000 菌株各挑取一环接种于盛有 25ml B 培养基的三角瓶中，30℃，170r/min 的速度振荡培养 48h，计数菌体数。活化培养好的大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 各挑取一环接种于盛有 25ml LB 液体培养基的三角瓶中，37℃，170r/min 下振荡培养 24h，计数菌体数。采用对峙试验法，比较两株生防菌的抑菌能力大小。

对峙培养试验表明，在平板上短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）与大肠杆菌菌株 K88

和菌株 K88-gfp 之间都产生了空白区带，抑制作用十分明显而且随着培养时间延长，对峙的两种菌都不会跨越这条区带；培养 48h 时在菌株 K88 和菌株 K88-gfp 的平板上抑菌带均为 3mm;而在菌株 BS-2000 与菌株 K88 和菌株 K88-gfp 的对峙平板上都没有产生抑菌带（图 7-27，图 7-28）。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）是一个对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 抑制力很强的芽胞杆菌，而菌株 K88 转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）后，对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的抑制作用并没有影响。下一步将使用抑菌圈法试验分析拮抗菌发酵液对大肠杆菌菌株 K88 及转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）的菌株 K88（标记为 K88-gfp）的抑制作用。

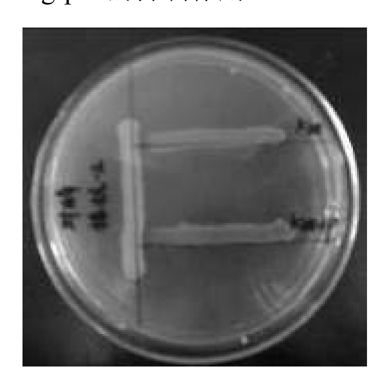


图 7-27　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对 K88 和 K88-gfp 菌株都能产生抑菌带

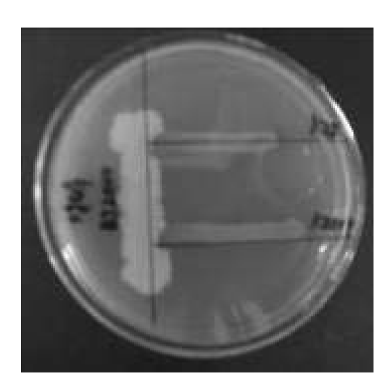


图 7-28　菌株 BS-2000 对 K88 和 K88-gfp 菌株都不能产生抑菌带

三、芽胞杆菌对大肠杆菌的抑制效应

对于供试靶标菌株和生防菌株，菌株培养所用的培养基及菌株的培养方法均同。采用直接培养的生防菌培养液进行抑菌圈试验，比较两株生防菌菌株抑菌能力的大小。抑菌圈试验表明，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 都能产生十分明显的抑菌圈，并且抑菌圈均为 18mm，是一个对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 抑制力很强的芽胞杆菌；而菌株 BS-2000 对菌株 K88 和菌株 K88-gfp 都不能产生明显的抑菌圈，只是会长出不规则状的菌苔。菌株 K88 转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）后，对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的抑制作用并没有影响。采用直接培养的生防菌培养液进行抑菌圈试验，生防菌菌株很容易在培养基上生长，对试验结果的观察与准确性会造成一定的影响，因此，下一步将使用胞外抑菌物质进行抑菌试验比较这两株菌株对大肠杆菌的抑制作用（图 7-29，图 7-30）。

四、芽胞杆菌胞外抑菌物的测定

对于供试靶标菌株和生防菌株，菌株培养所用的培养基及菌株的培养方法均同。生防菌胞外物质的提取方法：摇瓶培养 48h 短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）和菌株 BS-2000 的菌液于 8000r/min 离心 20min，取上清液用细菌过滤器过滤除去上清液中的菌体，即得胞外物质。采用胞外抑菌物质进行抑菌圈试验比较两株生防菌菌株的抑菌能力大小。抑

菌效果测定结果表明，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的胞外物质对菌株 K88 和菌株 K88-gfp 都能产生十分明显的抑菌圈，抑菌圈均为 15mm，同样也证明该菌株是一个对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 抑制力很强的芽胞杆菌；而菌株 BS-2000 对菌株 K88 和菌株 K88-gfp 都没有产生明显的抑菌圈。菌株 K88 转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）后对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的抑制作用并没有影响（图 7-31，图 7-32）。下一步将研究拮抗菌株的作用浓度对大肠杆菌的抑制作用。

图 7-29　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）（左、右）对 K88 菌株能产生抑菌圈，菌株 BS-2000（上、下）对 K88 菌株不能产生抑菌圈

图 7-30　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）（左、右）对 K88-gfp 菌株能产生抑菌圈，菌株 BS-2000（上、下）对 K88-gfp 菌株不能产生抑菌圈

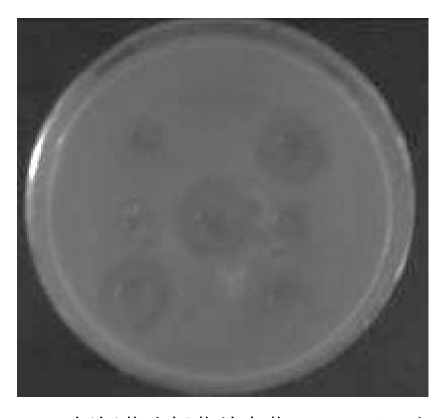


图 7-31　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对 K88 菌株能产生抑菌圈，菌株 BS-2000 对 K88 菌株不能产生抑菌圈

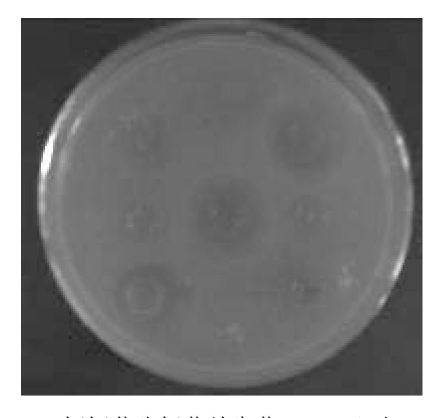


图 7-32　短短芽胞杆菌益生菌(LPF#2)对 K88-gfp 菌株能产生抑菌圈，菌株 BS-2000 对 K88-gfp 菌株不能产生抑菌圈

五、芽胞杆菌拮抗能力的浓度效应

对于供试靶标菌株和生防菌株，菌株培养所用的培养基及菌株的培养方法均同。设两个处理，处理一：生防菌短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）和菌株 BS-2000 上清液梯度稀释 0 倍、10 倍、10^2 倍、10^3 倍，采用抑菌圈法，比较两株生防菌菌株的不同作用浓度对靶标菌株抑菌能力的大小（表 7-15）。处理二：靶标菌株大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 的发酵液的菌体数调成 10^7CFU/ml、10^6CFU/ml、10^5CFU/ml，采用抑菌圈法，

比较两株生防菌菌株对不同浓度靶标菌株抑菌能力的大小（表 7-16）。

表 7-15　处理一的抑菌圈结果

大肠杆菌	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）上清液处理抑菌圈直径/mm			
	0 倍	10 倍	10^2 倍	10^3 倍
K88	28	21	15	0
K88-gfp	27	21	13	0

表 7-16　处理二的抑菌圈结果

大肠杆菌	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）上清液处理抑菌圈直径/mm		
	10^7CFU/mL	10^6CFU/mL	10^5CFU/mL
K88	26	27	27
K88-gfp	25	27	27

试验结果表明，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）上清液对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 的抑制作用都十分明显；但拮抗能力会随稀释倍数的增加而减小，当短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）上清液稀释倍数达 10^3 后就无法产生明显的抑菌圈，对大肠杆菌就没有抑制作用了。另外，单方面稀释大肠杆菌，在平板上无法证明短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的拮抗能力会随大肠杆菌稀释倍数的增加而增加。比较大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 平板上的抑菌圈，对这两菌株而言差异并不大，可以确定 K88 转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）后，对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的拮抗作用并没有影响。

六、培养基 pH 对芽胞杆菌拮抗能力的影响

供试靶标菌株和生防菌株，靶标菌株培养所用的培养基及菌株的培养方法均同。生防菌用 B 培养基，其 pH 调为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0（灭菌后用 80%乳酸和过饱和 Na_2CO_3 调节培养基 pH）。采用生防菌胞外物质进行抑菌圈试验。比较不同 pH 条件下培养的两株生防菌菌株胞外抑菌物质对靶标菌株的抑菌能力大小。

试验结果表明，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的胞外物质对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 的抑制作用都十分明显。在菌株 K88 和菌株 K88-gfp 平板上均显示 pH7.5 的培养基里发酵的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）产生的抑菌圈最大，分别为 14.50mm 和 18.50mm；并且在偏酸（pH6.0）及偏碱（pH8.0）的培养基里发酵，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）产生的抑制作用仍然较强，能产生较大的抑菌圈。另外，比较大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 平板上的抑菌圈，对这两菌株而言差异并不大，可以确定菌株 K88 转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）后，对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的拮抗作用并没有影响（表 7-17）。

表 7-17　在不同 pH 下发酵的两菌株的抑菌圈　　（单位：mm）

培养基 pH	菌株 K88	菌株 K88-gfp
6.0	10.50b	10.75b
6.5	11.25b	11.50b
7.0	12.75ab	15.50ab
7.5	14.50a	18.50a
8.0	12.75ab	14.00ab

注：在同一栏内，带相同字母的数字在 Duncan's 新复极差测验的多重比较 P<0.01 时没有差异

七、通气量对芽胞杆菌拮抗能力的影响

对于供试靶标菌株和生防菌株，菌株培养所用的培养基及靶标菌株的培养方法均同上。生防菌短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）和菌株 BS-2000 培养转速分别为 90r/min、120r/min、150r/min、180r/min、210r/min，培养 48h 后，分别提取胞外物质测定抑菌圈，比较不同转速条件下培养的拮抗菌液对靶标菌株抑菌能力的大小。

试验结果表明，不同转速条件下短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的无菌滤液对大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 的抑制作用都十分明显，而菌株 BS-2000 对菌株 K88 和菌株 K88-gfp 都没有产生明显的抑菌圈。虽然在菌株 K88 平板上显示 210r/min 发酵的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）产生的抑菌圈最大，为 15mm，但总体来看，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的发酵转速快慢对其抑制能力没有太大影响（表 7-18）。另外比较大肠杆菌菌株 K88 和菌株 K88-gfp 平板上的抑菌圈，对这两菌株而言差异并不大，可以确定菌株 K88 转入绿色荧光蛋白基因（*gfp*）后，对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的拮抗作用并没有影响。

表 7-18　两菌株不同发酵转速的抑菌圈　　（单位：mm）

发酵转速/（r/min）	菌株 K88	菌株 K88-gfp
90	14.75ab	14.25a
120	13.75c	14.75a
150	14.25bc	14.00a
180	14.00c	14.25a
210	15.00a	14.25a

注：在同一栏内，带相同字母的数字在 Duncan's 新复极差测验的多重比较 P<0.01 时没有差异

八、芽胞杆菌在小白鼠体内的定殖特性

在应用短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）作为益生素之前，首先要了解该菌在动物体内的定殖情况，以小白鼠为动物模型，将短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 为供试菌株，研究其在动物体内的定殖和循环。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株的发酵

培养基：豆饼粉 3g、蛋白胨 0.2g、蔗糖 0.2g、玉米淀粉 0.8g、KH_2PO_4 0.07g、$MgSO_4$ 0.03g，加水稀释至 100ml（与前面筛选出的培养基不同），接菌时在每毫升培养基中加入 1μl 浓度为10mg/ml的红霉素。接菌后置30℃、170r/min下培养24h，活菌量为1.8×10^9CFU/ml。定殖试验，取均重为 21g 左右的小白鼠 20 只，分为两组，处理组 14 只，对照组 6 只，将短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 培养液（活菌量 1.8×10^9CFU/ml）按 0.2ml/只的量拌入饲料，对小白鼠口服饲喂 1d，上午、下午各一次[相当于活菌量 7.2×10^8CFU/（ml·d）]，以加清水饲料为对照。然后采用正常的饲料继续饲喂，饲喂后的第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天各取样一只解剖，取胃、近胃端小肠、中部小肠、大肠等 4 个部位的内容物在 LB+红霉素的平板上培养，观察短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株的定殖情况。另将胃和肠匀浆后置荧光显微镜下镜检，观察有无荧光菌株，确定菌株定殖的情况。试验结果见表 7-19，处理组小白鼠经口服饲喂高剂量短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 后会出现呆滞、倒毛等现象，并且在不同的解剖部位可观察到发荧光菌株的存在，而且水处理的对照组生长正常。口服饲喂高剂量短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株的小白鼠在第 1 天活动呆滞，食量减少，胃、近胃端小肠、中部小肠皆发现发绿色荧光的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株，大肠中未发现；在第 2 天出现倒毛现象，不取食，病情加重，胃部发现发绿色荧光的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株，而近胃端小肠、中部小肠、大肠等部位未发现发绿色荧光的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株；第 3 天后，小白鼠健康状态恢复正常，取食正常，此时解剖的小白鼠，胃、近胃端小肠、中部小肠皆未发现发绿色荧光的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株，仅在大肠处发现短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌，直到第 6 天时，情况与之前相同。

表 7-19　口服饲喂小白鼠消化道内短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株定殖情况

天数/d	健康状况	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株存活情况			
		胃	胃端小肠	中部小肠	大肠
1	呆滞	+	+	+	−
2	倒毛	+	−	+	−
3	正常	−	−	−	+
4	正常	−	−	−	+
5	正常	−	−	−	+
6	正常	−	−	−	+

注：“+”表示有短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-GFP 菌株存活，“−”表示无短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-GFP 菌株存活

研究结果表明，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株在前 2d 进入小白鼠的胃部和小肠，但在大肠处未发现，第 3～6 天，小白鼠恢复健康后，菌株已从胃和小肠进入了大肠，并稳定在大肠处。高剂量的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 菌株在胃部和小肠处能引起小白鼠的不适，进入大肠后，小白鼠恢复健康；大肠是该菌的宿留地（图 7-33）。

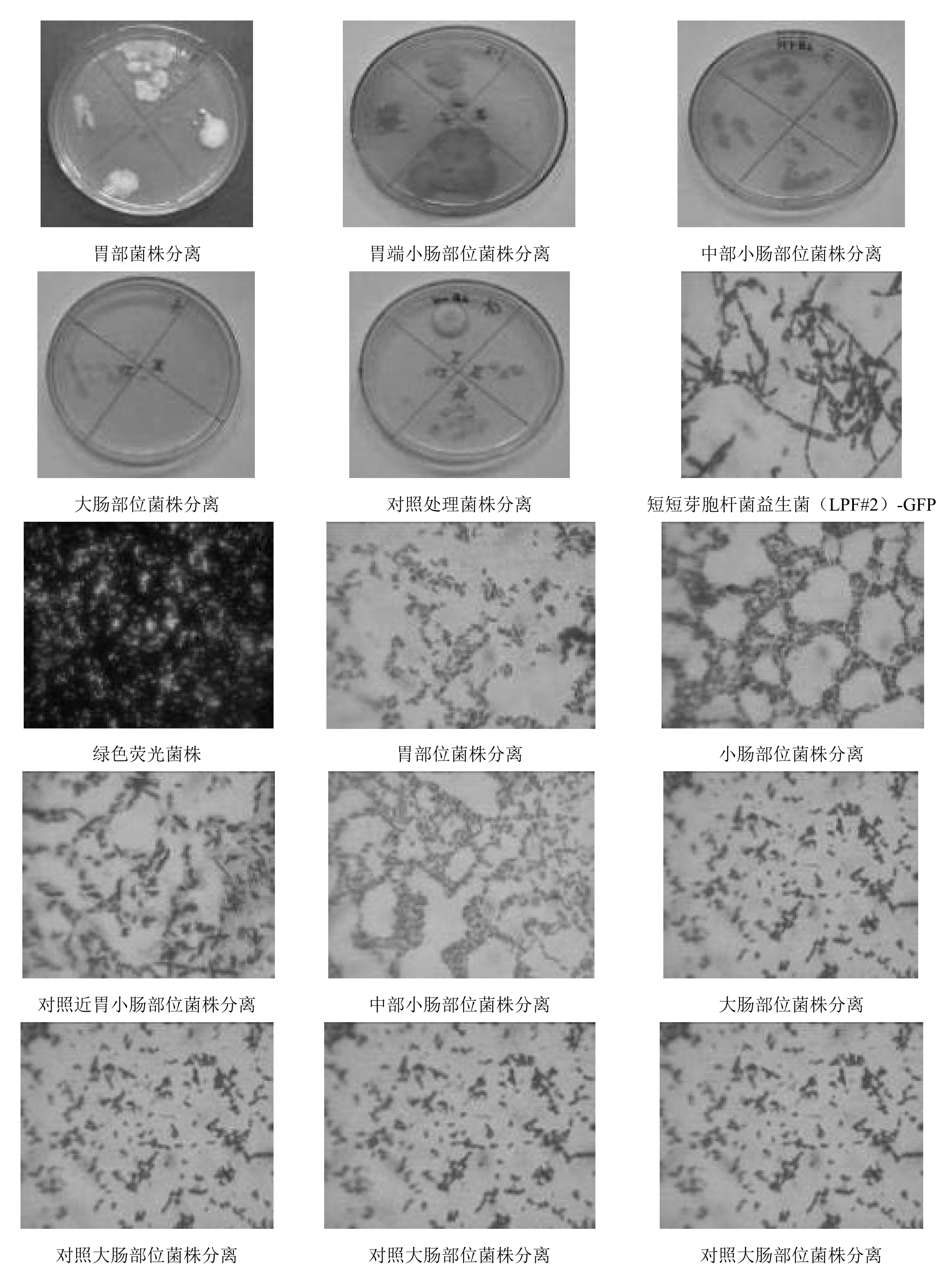


图 7-33　口服饲喂短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）-gfp 的小白鼠消化道菌落图

九、芽胞杆菌小白鼠毒力时间动力学模型

本试验以小白鼠为动物模型，测定高浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠

毒力时间的动力学模型，为确定短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的使用浓度提供依据。毒力时间的测试：取平均体重为21g左右的小白鼠20只，随机分成两组，每组10只。将短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液（活菌量 3×10^9CFU/ml）按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射，观察12h、24h、48h、72h、96h、120h、142h、164h，以培养基为对照。

试验结果见表7-20，注射高浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液（活菌量 30×10^8CFU/ml）的小白鼠，12h未出现死亡，24h死亡率达80%，48h死亡率达85%，96h死亡率达100%，而对照组小白鼠164h内全部存活。从图7-34可见，死亡小白鼠消化道内出现大量的目标细菌短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）菌株。

表7-20　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠致死作用

时间/h	死亡率/%	
	处理组	对照组
12	0	0
24	80	0
48	85	0
72	95	0
96	100	0
120	100	0
142	100	0
164	100	0

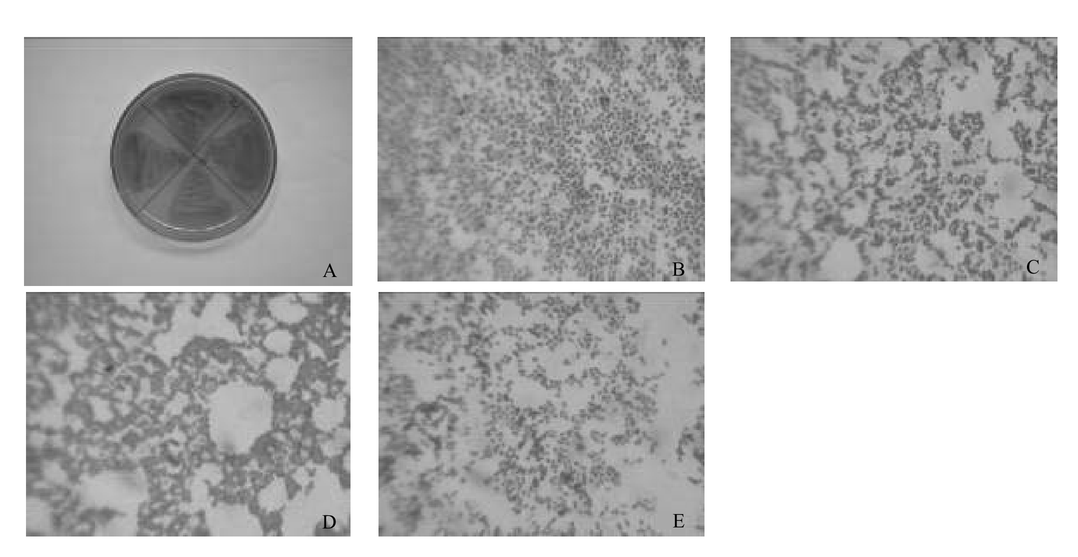


图7-34　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液的小鼠消化道内菌落形状

A. 平板培养；B. 胃；C. 近胃端小肠；D. 中部小肠；E. 大肠

短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠致死时间 LC_{50} 和 LC_{90} 的统计分析结果见表7-21。建立的模型为：$Y=-15.1874+15.2361X$ （$R^2=0.9813$），模型的统计检验

见表 7-20，模型回归截距 *A* 标准误为 34.1280，回归系数 *B* 标准误为 29.0495，*F* 检验值为 77.7600，达极显著水平。高浓度（活菌量 30×10^8CFU/ml，1ml/只）短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠的致死时间 LC_{50} 为 21.13h，LC_{90} 为 25.65h（表 7-21～表 7-23）。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠的致死时间动力学模型为：y=33.684Ln（x）−58.576，R^2=0.41。

表 7-21　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠致死时间 LC_{50} 和 LC_{90} 的统计分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
12.00	1.08	0.00	0.01
24.00	1.38	80.00	5.84
48.00	1.68	85.00	6.04
72.00	1.86	95.00	6.64
96.00	1.98	100.00	9.99

表 7-22　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠致死时间模型的统计检验

回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
−15.1874	34.1280	15.2361	29.0495	0.9813	77.7600	0.0031

表 7-23　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠的致死时间 LC_{50} 和 LC_{90}

LD_{50}	对数时间=	20.19	95%置信区	1.23	–	1.44
	时间=	21.13	95%置信区	16.88	–	27.42
LD_{90}	对数时间=	21.47	95%置信区	1.31	–	1.53
	时间=	25.65	95%置信区	20.22	–	33.79

短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力时间动力学模型的研究目的是了解益生菌对小白鼠毒力作用的时间特性，采用高浓度菌液进行研究，目的是了解小白鼠对菌的极限耐受能力。研究结果表明，将高浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液（活菌量 30×10^8CFU/ml）按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射，小白鼠的体重平均为 21g，相当于每克体重的小白鼠接受 1.420×10^8CFU/ml 菌量，这一浓度是很高的。观察 12h、24h、48h、72h、96h、120h、142h、164h 的死亡率，96h 死亡率达 100%，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠的致死时间 LC_{50} 为 21.13h，说明高浓度的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠具有较高的毒性。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠的致死时间动力学模型为：y=33.684ln（x）−58.576，R^2=0.41（图 7-35）。

十、芽胞杆菌小白鼠毒力浓度动力学模型

以小白鼠为动物模型，检测不同短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）浓度对小白鼠的作用情况，测定小白鼠对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的最高浓度耐受力。菌株的发酵

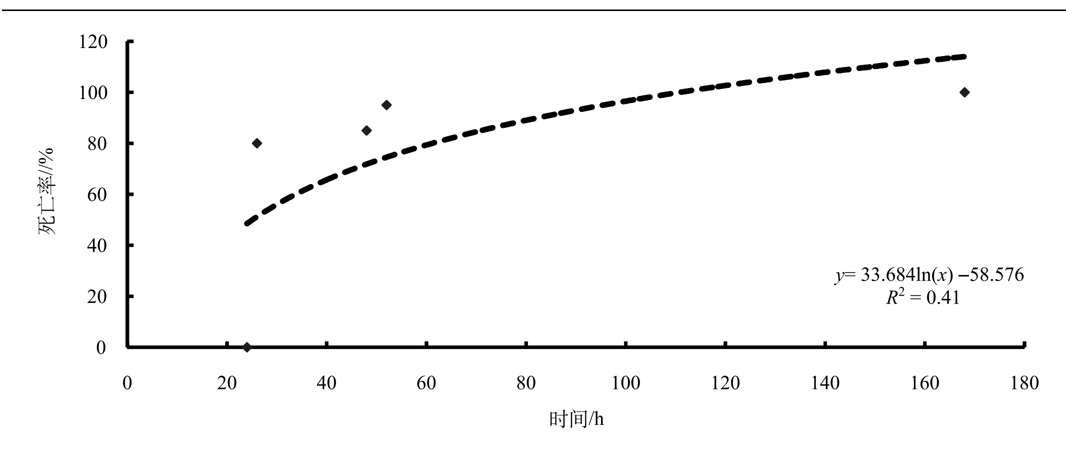


图 7-35　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵原液对小白鼠的致死时间动力学模型

培养同前。毒力的浓度测试，平均体重为 27g 左右的小白鼠 100 只，随机分成 10 组，每组 10 只（其中公 5 只，母 5 只），将浓度为 30×10^{8}CFU/ml 的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）液分别按 0 倍、10 倍、20 倍、40 倍、60 倍、80 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍稀释，设空白培养基液为对照，分别按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射，48h 观察各组死亡率，建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力浓度动力学模型。

试验结果见表 7-24。注射不同浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后，随着菌液浓度的提高，小白鼠的死亡率逐渐升高，浓度在 0.5×10^{8}CFU/ml 以下，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠无毒性，死亡率为 0；浓度为 0.75×10^{8}CFU/ml 时，死亡率为 10%；浓度为 3×10^{8}CFU/ml 时，死亡率为 60%；浓度为 30×10^{8}CFU/ml 时，死亡率为 80%。不同浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 LC_{50} 和 LC_{90} 的统计分析结果见表 7-25，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度模型为 y=3.9894+2.6392x（R^2=0.9719），经过统计检验回归截距 A 的标准误为 0.4767，回归系数 B 的标准误为 0.7944，F 检验值为 119.3822，显著水平 P 为 0.0001 极显著（表 7-26）。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 LC_{50} 为 2.41×10^{8}CFU/ml，即 30×10^{8}CFU/ml 短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）稀释 12.5 倍 48h 能引起小白鼠 50%的死亡率，LC_{90} 为 7.39×10^{8}CFU/ml，即 30×10^{8}CFU/ml 短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）稀释 4.05 倍 48h 能引起小白鼠 90%的死亡率（表 7-27）。计算利用短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 LC_1 和 LC_{10} 分别为 0.32×10^{8}CFU/ml 和 0.79×10^{8}CFU/ml（表 7-28），也证明了浓度在 0.5×10^{8}CFU/ml 以下，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠无毒性，死亡率为 0。

表 7-24　不同浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠的毒力作用

项目	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液对小白鼠的毒力作用								
稀释倍数	0	10	20	40	60	80	100	1 000	10 000
含菌量（10^{8}CFU/ml）	30	3	1.5	0.75	0.5	0.375	0.300	0.03	0.003
死亡率/%	80	60	30	10	0	0	0	0	0

表 7-25　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 LC_{50} 和 LC_{90} 的统计分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
30.00	1.48	80.00	5.84
3.00	0.48	60.00	5.25
1.50	0.18	30.00	4.48
0.75	−0.12	10.00	3.72
0.50	−0.30	0.00	0.01
0.38	−0.43	0.00	0.01
0.30	−0.52	0.00	0.01
0.03	−1.52	0.00	0.01
0.00	−2.52	0.00	0.01

表 7-26　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度模型的统计检验

回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
3.9894	0.4767	2.6392	0.7944	0.9719	119.3822	0.0001

表 7-27　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠的致死浓度 LC_{50} 和 LC_{90}

	对数浓度	95%置信区	浓度	95%置信区
LC_{50}	1.01	0.29～0.48	$2.41×10^8$CFU/ml	1.96～3.00
LC_{90}	2.29	0.76～0.98	$7.39×10^8$CFU/ml	5.81～9.62

表 7-28　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 LC_1 和 LC_{10}

	对数浓度	95%置信区	浓度	95%置信区
LC_1	−1.32	−0.60～−0.41	$0.32×10^8$CFU/ml	0.25～0.39
LC_{10}	−0.27	−0.19～−0.02	$0.79×10^8$CFU/ml	0.64～0.96

短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力浓度动力学模型为：y=2.4351x^2−33.851x+112.14，R^2 =0.9786，模型为二次曲线，根据曲线，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠的安全浓度为 $0.5×10^8$CFU/ml（图 7-36）。

短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力浓度动力学模型的研究目的是为了了解益生菌对小白鼠的致毒浓度。将浓度为 $30×10^8$CFU/ml 的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）液分别按 0 倍、10 倍、20 倍、40 倍、60 倍、80 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍稀释，分别按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射，48h 观察各组死亡率，建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力浓度动力学模型。研究结果表明高于 $0.75×10^8$CFU/ml 浓度，能造成小白鼠 10%以上的死亡率，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 LC_{50} 为 $2.41×10^8$CFU/ml，即 $30×10^8$CFU/ml 短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）稀释 12.5 倍 48h

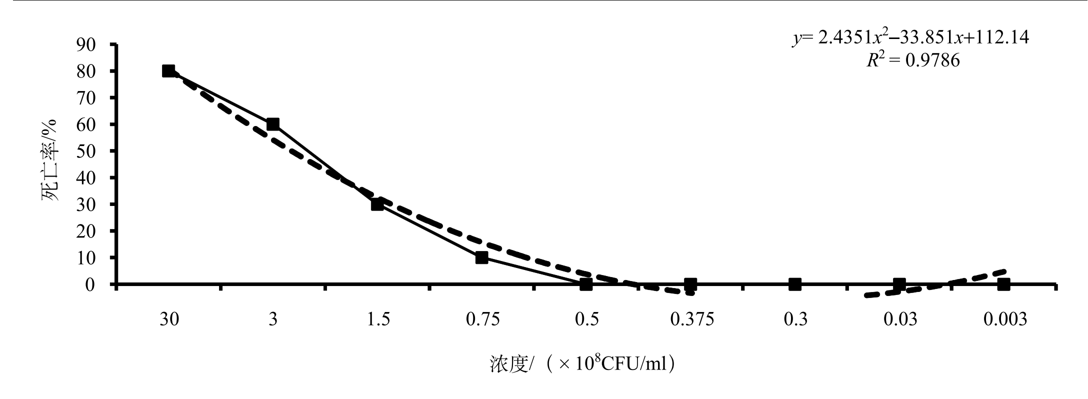


图 7-36　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力浓度动力学模型

能引起小白鼠 50%的死亡率，选用的小白鼠平均体重为 21g，相当于每克体重小白鼠承受 3.5×10^6CFU/ml 浓度的菌，死亡率为 50%。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度模型为 y=3.9894+2.6392x　（R^2=0.9719），计算短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠致死浓度 $LC_1=0.32\times10^8$CFU/ml，即造成小白鼠 1%死亡率的浓度应低于 0.32×10^8CFU/ml。短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠毒力浓度动力学模型为 $y=2.4351x^2-33.851x+112.14$，$R^2$=0.9786，模型为二次曲线，根据曲线，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠的安全浓度为 0.5×10^8CFU/ml。结合两个模型的分析，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠的安全浓度为 0.3×10^8CFU/ml，即每克小白鼠体重接受短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的安全浓度为 1.3×10^6CFU/ml。说明短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠十分安全。

十一、芽胞杆菌小白鼠促长作用的动力学模型

以小白鼠为动物模型，检测不同短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）浓度对小白鼠的作用情况，测定小白鼠对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的最高耐受力。对小白鼠促长作用测试：取平均体重为 27g 的小白鼠 47 只，随机分成 10 组，每组 5 只（其中公 2 只，母 3 只），对照鼠 3 只（公）。将浓度为 30×10^8CFU/ml 的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）液分别按 0 倍、10 倍、20 倍、40 倍、60 倍、80 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍稀释，各按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射，设空白培养基注射为对照。7d 后观察小白鼠的生长状况，记录采食量及起始体重、终点体重，计算增重、增重率、取食量、饲料效率。计算方法如下。

$$\text{增重} = \text{终点体重} - \text{起始体重}$$

$$\text{增重率（\%）} = \frac{\text{终点重量} - \text{起始重量}}{\text{起点重量}}$$

$$\text{饲料效率（g/g）} = \frac{\text{取食量}}{\text{增重}}$$

实验结果见表 7-29。从表 7-29 可见，注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后，高浓度的菌液对小白鼠生长有抑制作用，计算各浓度下小白鼠的增重，见表 7-30，可以看到

30×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 0 倍），小白鼠增重为–3.90g，3×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 10 倍）为 4.61g，利用二次曲线建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重模型：$y=-0.2448x^2+3.1312x-3.741$，$R^2=0.6251$（图 7-37）。

表 7-29　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）不同稀释倍数对小白鼠的生长作用

项目	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液注射小白鼠后的生长状况									
	0 倍	10 倍	20 倍	40 倍	60 倍	80 倍	100 倍	1000 倍	10000 倍	CK
含菌量/（$\times10^8$CFU/ml）	30	3	1.5	0.75	0.5	0.375	0.300	0.03	0.003	0
起始平均重量/g	26.87	26.05	26.27	25.61	24.52	28.29	24.60	26.42	27.23	29.85
终止平均重量/g	22.97	30.66	31.68	29.57	30.65	33.63	30.40	31.43	30.76	34.53

表 7-30　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）不同稀释倍数对小白鼠增重的影响

项目	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液注射小白鼠									
	0 倍	10 倍	20 倍	40 倍	60 倍	80 倍	100 倍	1000 倍	10000 倍	CK
含菌量/（$\times10^8$CFU/ml）	30	3	1.5	0.75	0.5	0.375	0.300	0.03	0.003	0
增重/g	–3.90	4.61	5.41	3.96	6.13	5.34	5.80	5.01	3.53	4.68

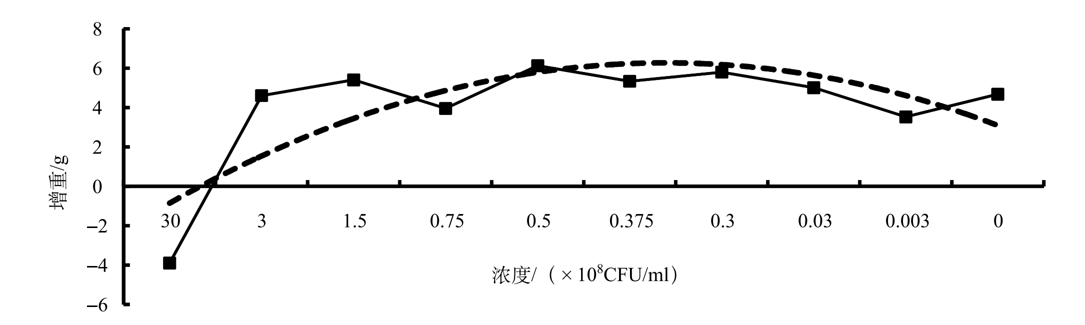


图 7-37　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重模型

计算各浓度下小白鼠的增重率，见表 7-31，可以看到 30×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 0 倍），小白鼠增重率为–14.51%，3×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 10 倍）为 17.70%，利用二次曲线建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重率模型：$y=-0.9993x^2+12.499x-14.842$，$R^2=0.64$（图 7-38）。

表 7-31　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）不同稀释倍数对小白鼠增重率的影响

项目	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液注射小白鼠									
	0 倍	10 倍	20 倍	40 倍	60 倍	80 倍	100 倍	1000 倍	10000 倍	CK
含菌量/（$\times10^8$CFU/ml）	30	3	1.5	0.75	0.5	0.375	0.300	0.03	0.003	0
增重率/%	–14.51	17.70	20.59	15.46	25	18.88	23.57	18.96	12.96	15.68

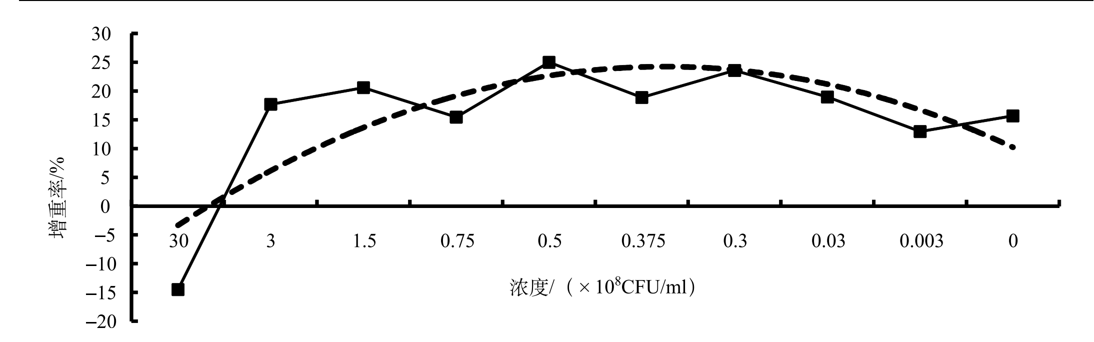


图 7-38　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重率模型

计算各浓度下小白鼠的取食量，见表 7-32，可以看到 30×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 0 倍），小白鼠取食量为 79.98g，3×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 10 倍）为 147.15g，利用二次曲线建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重率模型：$y=-3.1484x^2+37.505x+59.484$，$R^2=0.6467$（图 7-39）。

表 7-32　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）不同稀释倍数对小白鼠取食量的影响

项目	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液注射小白鼠									
	0 倍	10 倍	20 倍	40 倍	60 倍	80 倍	100 倍	1000 倍	10000 倍	CK
含菌量/（$\times10^8$CFU/ml）	30	3	1.5	0.75	0.5	0.375	0.300	0.03	0.003	0
取食量/g	79.98	147.15	149.60	145.64	161.05	167.34	145.87	188.89	159.65	100.32

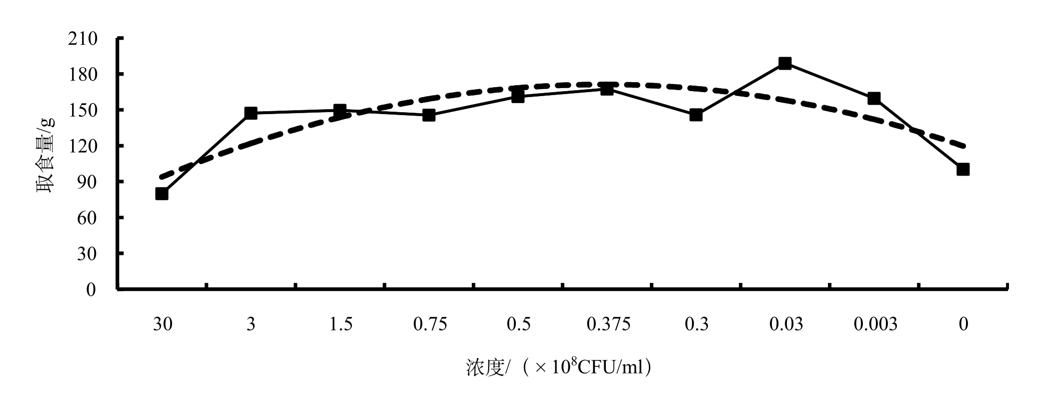


图 7-39　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长取食量模型

计算各浓度下小白鼠的饲料效率，见表 7-33，可以看到 30×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 0 倍），小白鼠饲料效率为−0.20g/g，3×10^8CFU/ml 浓度注射组（稀释 10 倍）为 0.16g/g，利用二次曲线建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的饲料效率模型：$y=-3.1484x^2+37.505x+59.484$，$R^2=0.6467$（图 7-40）。

表 7-33　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）不同稀释倍数对小白鼠取食量的影响

项目	短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵液注射小白鼠									
	0 倍	10 倍	20 倍	40 倍	60 倍	80 倍	100 倍	1000 倍	10000 倍	CK
含菌量/（$\times10^8$CFU/ml）	30	3	1.5	0.75	0.5	0.375	0.300	0.03	0.003	0
饲料效率/g/g	−0.20	0.16	0.18	0.14	0.19	0.16	0.17	0.15	0.14	0.14

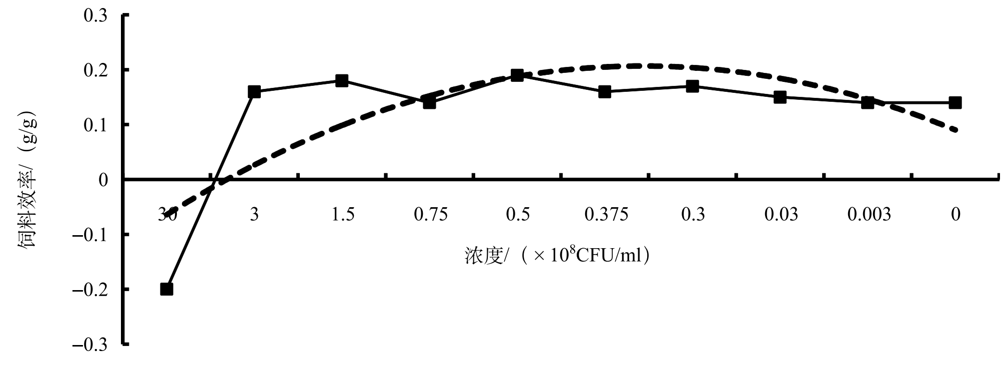


图 7-40　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的饲料效率模型

短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对小白鼠生长动力学模型的研究目的是了解益生菌对小白鼠生长的影响。研究结果表明，高浓度的短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）注射小白鼠，引起小白鼠体重下降，低浓度短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）注射小白鼠，会促进小白鼠的进食，提高饲料效率。利用二次曲线建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重率模型：$y=-3.1484x^2+37.505x+59.484$（$R^2=0.6467$），在安全浓度 0.03～0.3×$10^8$CFU/ml 下，小白鼠增重为 5.01～5.80g，高于对照组 4.68g。建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的生长增重率模型：$y=-0.9993x^2+12.499x-14.842$（$R^2=0.64$），在安全浓度 0.03～0.3×$10^8$CFU/ml 下，小白鼠增重率为 18.96～23.57g，高于对照组 15.68g。利用二次曲线建立短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）处理下小白鼠的饲料效率模型：$y=-3.1484x^2+37.505x+59.484$（$R^2=0.6467$）。在安全浓度 0.03～0.3×$10^8$CFU/ml 下，小白鼠饲料效率为 0.15～0.17g，高于对照组 0.14g。以上所用的小白鼠平均体重为 21g，除以 21g 可得出每克体重小白鼠增重、增重率、饲料效率的数据。

十二、芽胞杆菌感染菌株 K88 的小白鼠控病模型

短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发酵培养同上，用血球计数板计数，调整浓度为 30×10^8CFU/ml 备用。菌株 K88-gfp 培养后，调整菌液浓度为 20×10^8CFU/ml 并梯度稀释 8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍。取平均体重为 25g 左右的小白鼠 100 只，随机分成 10 组，每组 10 只。设处理组 5 组，对照组 5 组。处理组按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的 100 倍稀释液（相当于 0.30×10^8CFU/ml 浓度），对照组注射稀释 100 倍的液体培养液，48h 后分别注射 8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍稀释的菌株 K88-gfp 菌液，相当于大肠杆菌 K88 菌株浓度为 2.5×10^8CFU/ml、

$1.25×10^8$CFU/ml、$0.625×10^8$CFU/ml、$0.3125×10^8$ CFU/ml、$0.15625×10^8$CFU/ml，注射大肠杆菌菌株 K88 后，分别于 2h、4h、8h、16h、32h、64h、128h、256h 观察小白鼠的死亡率，建立控病模型。

试验结果见表 7-34、表 7-35。处理组在接种病原菌前，按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的 100 倍稀释液（相当于 $0.30×10^8$CFU/ml 浓度），为小白鼠安全浓度，对照组在接种病原菌前，注射稀释 100 倍的无益生菌的培养基液，48h 后分别注射浓度为 $2.5×10^8$CFU/ml、$1.25×10^8$CFU/ml、$0.625×10^8$CFU/ml、$0.3125×10^8$CFU/ml、0.156 $25×10^8$CFU/ml 大肠杆菌菌株 K88，分别于 2h、4h、8h、16h、32h、64h、128h、256h 观察小白鼠的死亡率。研究结果表明，处理组小白鼠死亡率远远低于对照组，对照组的 5 个浓度引起小白鼠最终死亡率（256h）分别为 80%、70%、60%、40%、10%，处理组的 5 个浓度引起小白鼠最终死亡率（256h）分别为 50%、20%、10%、5%、0%，具有很好的防治效果（图 7-41、图 7-42）。

表 7-34　感染 K88-GFP 的小白鼠的感病特性

时间/h	对照组的死亡率/%（仅接菌 K88）				
	8 倍	16 倍	32 倍	64 倍	128 倍
	$2.5×10^8$CFU/ml	$1.25×10^8$CFU/ml	$0.625×10^8$CFU/ml	0.312 $5×10^8$CFU/ml	0.156 $25×10^8$CFU/ml
2	0	0	0	0	0
4	10	0	0	0	0
8	40	30	10	0	0
16	70	40	20	0	0
32	70	50	50	0	0
64	70	60	50	10	0
128	80	60	50	20	5
256	80	70	60	40	10

表 7-35　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对感染 K88-GFP 的小白鼠的控病特性

时间/h	处理组死亡率/%［先注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）再接菌 K88］				
	8 倍	16 倍	32 倍	64 倍	128 倍
	$2.5×10^8$CFU/ml	$1.25×10^8$CFU/ml	$0.625×10^8$CFU/ml	0.312 $5×10^8$CFU/ml	0.156 $25×10^8$CFU/ml
2	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0
64	10	0	0	0	0
128	30	10	0	0	0
256	50	20	10	5	0

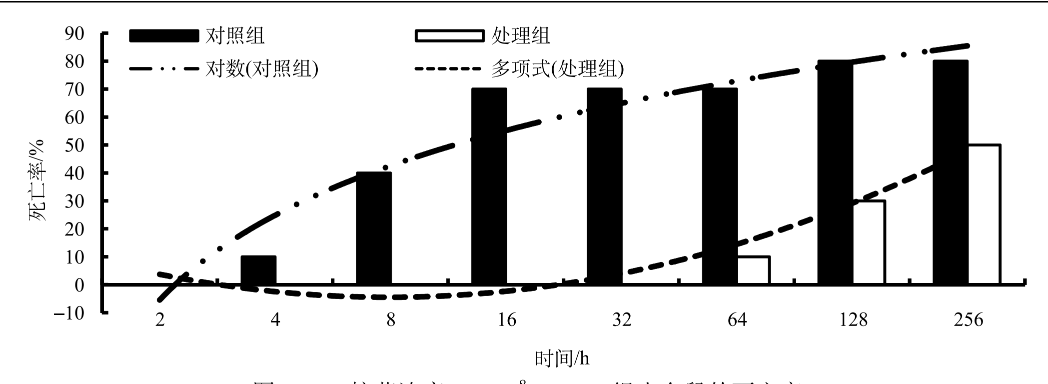


图 7-41　接菌浓度 2.5×10⁸CFU/ml 组小白鼠的死亡率

对照组. $y = 43.682\ln(x) - 5.4041$（$R^2 = 0.9243$）；处理组. $y = 2.0833x^2 - 12.44x + 14.107$（$R^2 = 0.9653$）

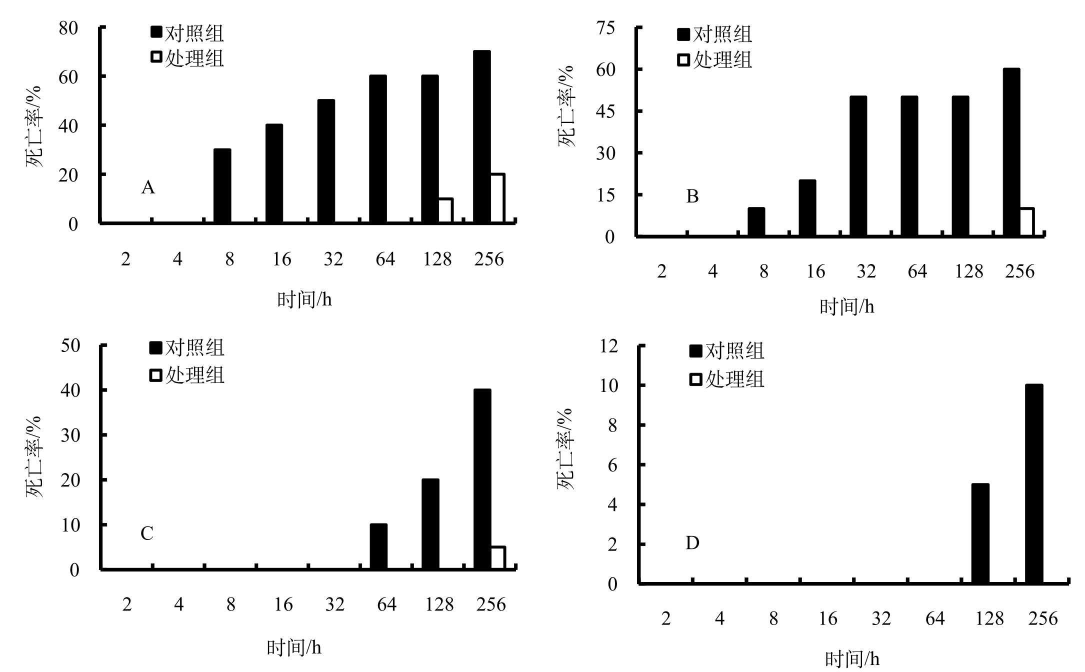


图 7-42　短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）对感染菌株 K88 的小白鼠控病模型

A. 接菌浓度 1.25×10⁸CFU/ml 组小白鼠死亡率；B. 接菌浓度 0.625×10⁸CFU/ml 组小白鼠死亡率；C. 接菌浓度 0.3125×10⁸CFU/ml 组小白鼠死亡率；D. 接菌浓度 0.156 25×10⁸CFU/ml 组小白鼠死亡率

不同处理小白鼠感染大肠杆菌菌株 K88-gfp 致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析结果见表 7-36。在高浓度组（2.5×10⁸CFU/ml），对照组的 LT_{50} 为 16.10h，处理组 LT_{50} 为 246.39h，后者为前者的 15.3 倍；在低浓度组（0.156 25×10⁸CFU/ml），对照组最终的死亡率达 10%，而处理组则无死亡。处理组在接种病原菌前，按 1ml/只对小白鼠进行腹腔注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的 100 倍稀释液（相当于 0.30×10⁸CFU/ml 浓度），能起到很好的延缓病害和控制病害的作用。详细分析见表 7-37～表 7-54。

表 7-36　不同处理小白鼠感染大肠杆菌 K88-GFP 的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

处理	项目	接病原菌浓度				
		2.5 ×10^8CFU/ml	1.25 ×10^8CFU/ml	0.625 ×10^8CFU/ml	0.312 5 ×10^8CFU/ml	0.156 25 ×10^8CFU/ml
对照组（仅接菌株 K88）						
对照组	方程	Y=3.49+1.25X	Y=3.37+0.98X	Y=3.07+0.98X	Y=0.16+1.91X	Y=–0.18+1.62X
	LT_{50}	16.10	46.70	91.84	347.26	1 543.10
	LT_{90}	169.92	950.46	1 838.97	1 633.79	9 495.95
处理组［先注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）再接菌株 K88］						
处理组	方程	Y=–0.08+2.12X	Y=–0.45+1.92X	Y=–26.18+12.42X	Y=–23.64+11.21X	—
	LT_{50}	246.39	685.66	324.68	358.91	—
	LT_{90}	988.66	3180.02	411.79	466.99	—

表 7-37　大肠杆菌菌株 K88-gfp 2.5×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	10.00	3.72
8.00	0.90	40.00	4.75
16.00	1.20	70.00	5.52
32.00	1.51	70.00	5.52
64.00	1.81	70.00	5.52
128.00	2.11	80.00	5.84
256.00	2.41	80.00	5.84

表 7-38　大肠杆菌菌株 K88-gfp 2.5×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 A	标准误	回归系数 B	标准误	相关系数	F 检验值	显著水平 P
	3.49	0.64	1.25	0.56	0.92	34.47	0.001
Y=3.49+1.25X							
LT_{50}	对数浓度=	1.51	95%置信区	0.73	—	2.32	
	浓度=	16.10	95%置信区	5.41	—	207.38	
LT_{90}	对数浓度=	2.79	95%置信区	1.48	—	4.16	
	浓度=	169.92	95%置信区	30.00	—	14454.87	

表 7-39　大肠杆菌菌株 K88-gfp 1.25×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	30.00	4.48
16.00	1.20	40.00	4.75
32.00	1.51	50.00	5.00

续表

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
64.00	1.81	60.00	5.25
128.00	2.11	60.00	5.25
256.00	2.41	70.00	5.52

表 7-40　大肠杆菌菌株 K88-gfp 1.25×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
	3.37	0.56	0.98	0.43	0.94	48.49	0.00
Y=3.37+0.98X							
LT_{50}	对数浓度=	1.63	95%置信区	1.11	—	2.97	
	浓度=	46.70	95%置信区	12.77	—	927.13	
LT_{90}	对数浓度=	2.92	95%置信区	2.05	—	5.21	
	浓度=	950.46	95%置信区	112.86	—	163 633.75	

表 7-41　大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.625×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	10.00	3.72
16.00	1.20	20.00	4.16
32.00	1.51	50.00	5.00
64.00	1.81	50.00	5.00
128.00	2.11	50.00	5.00
256.00	2.41	60.00	5.25

表 7-42　大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.625×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
	3.07	0.62	0.98	0.46	0.93	41.29	0.00
Y=3.07+0.98X							
LT_{50}	对数浓度=	1.93	95%置信区	1.32	—	3.45	
	浓度=	91.84	95%置信区	21.13	—	2 819.25	
LT_{90}	对数浓度=	3.21	95%置信区	2.26	—	5.68	
	浓度=	1 838.97	95%置信区	182.86	—	477 332.61	

表 7-43　大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.3125×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01

续表

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
8.00	0.90	0.00	0.01
16.00	1.20	0.00	0.01
32.00	1.51	0.00	0.01
64.00	1.81	10.00	3.72
128.00	2.11	20.00	4.16
256.00	2.41	40.00	4.75

表 7-44　大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.3125×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 A	标准误	回归系数 B	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *p*
	0.16	0.52	1.91	0.34	1.00	881.79	0.001
			Y=0.16+1.91X				
LT_{50}	对数浓度=	4.84	95%置信区	2.47	—	2.62	
	浓度=	347.26	95%置信区	292.06	—	417.05	
LT_{90}	对数浓度=	6.12	95%置信区	3.12	—	3.31	
	浓度=	1633.79	95%置信区	1316.79	—	2052.93	

表 7-45　大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.15625×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果（%）	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	0.00	0.01
16.00	1.20	0.00	0.01
32.00	1.51	0.00	0.01
64.00	1.81	0.00	0.01
128.00	2.11	5.00	3.36
256.00	2.41	10.00	3.72

表 7-46　大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.15625×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
	–0.18	0.73	1.62	0.48	0.99	201.94	0.00
			Y=–0.18+1.62X				
LT_{50}	对数浓度=	5.18	95%置信区	3.13	—	3.25	
	浓度=	1 543.10	95%置信区	1349.72	—	1 772.70	
LT_{90}	对数浓度=	6.46	95%置信区	3.91	—	4.05	
	浓度=	9 495.95	95%置信区	8047.42	—	11 272.60	

表 7-47　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 2.5×10⁸CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	0.00	0.01
16.00	1.20	0.00	0.01
32.00	1.51	0.00	0.01
64.00	1.81	10.00	3.72
128.00	2.11	30.00	4.48
256.00	2.41	50.00	5.00

表 7-48　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 2.5×10⁸CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分检验

项目	回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
	–0.08	0.57	2.12	0.38	1.00	777.00	0.00
Y=–0.08+2.12X							
LT_{50}	对数浓度=	5.08	95%置信区	2.30	—	2.49	
	浓度=	246.39	95%置信区	201.51	—	305.63	
LT_{90}	对数浓度=	6.36	95%置信区	2.89	—	3.11	
	浓度=	988.66	95%置信区	771.71	—	1 289.64	

表 7-49　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 1.25×10⁸CFU/ml 浓度感染小白鼠致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	0.00	0.01
16.00	1.20	0.00	0.01
32.00	1.51	0.00	0.01
64.00	1.81	0.00	0.01
128.00	2.11	10.00	3.72
256.00	2.41	20.00	4.16

表 7-50　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 1.25×10^{8}CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 A	标准误	回归系数 B	标准误	相关系数	F 检验值	显著水平 P
	–0.45	0.77	1.92	0.50	0.99	225.60	0.001
			Y=–0.45+1.92X				
LT_{50}	对数浓度=	5.45	95%置信区	2.75	—	2.92	
	浓度=	685.66	95%置信区	567.07	—	838.18	
LT_{90}	对数浓度=	6.74	95%置信区	3.40	—	3.61	
	浓度=	3 180.02	95%置信区	2521.81	—	4 064.62	

表 7-51　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.3125×10^{8}CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	0.00	0.01
16.00	1.20	0.00	0.01
32.00	1.51	0.00	0.01
64.00	1.81	0.00	0.01
128.00	2.11	0.00	0.01
256.00	2.41	10.00	3.72

表 7-52　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.3125×10^{8}CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 A	标准误	回归系数 B	标准误	相关系数	F 检验值	显著水平 P
	–26.18	1.18	12.42	0.76	1.00	150 241 150 346.72	0.00
			Y=–26.18+12.42X				
LT_{50}	对数浓度=	31.18	95%置信区	2.51	—	2.51	
	浓度=	324.68	95%置信区	324.68	—	324.68	
LT_{90}	对数浓度=	32.46	95%置信区	2.61	—	2.61	
	浓度=	411.79	95%置信区	411.79	—	411.79	

表 7-53　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.3125×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析

剂量	对数剂量	处理效果/%	概率值
2.00	0.30	0.00	0.01
4.00	0.60	0.00	0.01
8.00	0.90	0.00	0.01
16.00	1.20	0.00	0.01
32.00	1.51	0.00	0.01
64.00	1.81	0.00	0.01
128.00	2.11	0.00	0.01
256.00	2.41	5.00	3.36

表 7-54　注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）后大肠杆菌菌株 K88-gfp 0.3125×10^8CFU/ml 浓度感染小白鼠的致死时间 LT_{50} 和 LT_{90} 模型分析检验

项目	回归截距 *A*	标准误	回归系数 *B*	标准误	相关系数	*F* 检验值	显著水平 *P*
	–23.64	0.96	11.21	0.62	1.00	86 580 939 383.25	0.001
			Y=–23.64+11.21X				
LT_{50}	对数浓度=	28.64	95%置信区	2.55	—	2.55	
	浓度=	358.91	95%置信区	358.91	—	358.91	
LT_{90}	对数浓度=	29.92	95%置信区	2.67	—	2.67	
	浓度=	466.99	95%置信区	466.99	—	466.99	

研究表明芽胞杆菌能拮抗动物病原细菌，维持和调整肠道微生态平衡。程安春等（1994）研究证实饲用芽胞杆菌在体外能拮抗多种动物致病菌（K88ab、K88ac、猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌）。全艳玲（2002）用地衣芽胞杆菌与双歧杆菌、乳酸菌、大肠杆菌混合培养，发现地衣芽胞杆菌对大肠杆菌有抑制作用，而对双歧杆菌、乳酸菌有促进和共生作用。芽胞杆菌的拮抗作用可能是由于分泌了活性抗菌物质所引起的。早在 1949 年，Murray 等发现环状芽胞杆菌能产生细菌素。也有人报道芽胞杆菌的营养体在分泌胞外酶系的同时，在营养体形成芽胞过程中还产生抗生素，或分泌活性抗菌物质及挥发性代谢产物。淳泽和何明清（1994）的研究证明，芽胞杆菌能产生脂肪酸和蛋白质多肽类拮抗物质。但脂肪酸的含量极少，不足以拮抗致病病菌。有机酸物质的产生，有利于乳酸菌等优势菌群的生长繁殖，维护微生态平衡。在具体研究发酵动态对短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的抑菌能力影响时发现，对致病菌抑制作用的强弱与短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的培养时间及接种顺序有关。芽胞杆菌接种后，要适应一段时间才开始生长繁殖，在此基础上才能达最好的抑菌效果。这可能是芽胞杆菌发酵时间比较短，产生抑菌作用小的原因。在接种芽胞杆菌 48h 后，芽胞杆菌对致病菌有显著的抑菌作用，这与培养物中抑菌物质的累加可能有直接关系，但是这种抑菌作用随着时间的延长反而降低。因此在用作动物的保护剂时或制成产品时要充分考虑到发酵时间的影响。

同时也发现先接种致病菌 24h 后再接种芽胞杆菌，则无抑菌作用。这与淳泽和何明清（1994）的报道一致，他们在研究芽胞杆菌和致病菌的拮抗作用时发现，先接种芽胞杆菌后接种致病菌，拮抗作用最强；芽胞杆菌和致病菌同时接种次之；先接种致病菌后接种芽胞杆菌，拮抗作用最弱。

研究报道芽胞杆菌可以降低动物体内的大肠杆菌。刚孵化出来的雏鸡感染肠毒性大肠杆菌 078：K80 后，饲喂枯草芽胞杆菌可降低大肠杆菌的感染（Ragione *et al.*，2001）。芽胞杆菌对仔猪腹泻的治疗与预防效果较明显，Kyriakis 等（1999）报道，在患有仔猪断奶综合征的猪场中利用地衣芽胞杆菌来治疗仔猪腹泻，采食芽胞杆菌仔猪的死亡率较对照组降低 43.75%（$P<0.05$），腹泻率降低了 90%以上（$P<0.05$），粪便中溶血性大肠杆菌菌株 K88 的含量明显降低，消化道氨的含量显著降低。研究在对感染菌株 K88 的小白鼠模型的控病研究时发现，腹腔注射短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的小白鼠 LD_{50} 是不添加短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的对照组 LD_{50} 的 1.34 倍，使 18 倍、32 倍菌株 K88-gfp 稀释液的致病力降低，同时在前 12h，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）的处理组无死亡，而对照组的高浓度组已达 70%的致死率，说明短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）可以延缓死亡，降低死亡率。但也发现短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）可能也具有低毒力，低浓度 56 倍的菌株 K88-gfp 对照组不致死，添加了短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）发现有 20%死亡。因此在开发产品时可以考虑与其他益生菌的相互作用，更好地发挥益生效果。

十三、芽胞杆菌对鸡免疫功能影响

自 20 世纪 50 年代抗生素被用作添加剂使用以来，其给人类带来的负面影响也逐渐突出，长期使用抗生素会产生相应病菌的耐药性，引起动物免疫机能下降，同时也会导致药物残留，造成环境污染。益生素，又称为益生菌、活菌制剂或微生态制剂，其作为一种绿色饲料添加剂已广泛应用于畜牧生产中。由于其具有维持肠道菌群平衡、调节机体免疫、改善机体代谢、净化肠道环境等多方面的作用，且在使用过程中无毒性作用、无药物残留、不产生耐药性，因此已成为抗生素的理想替代品。本试验通过对雏鸡饲喂益生素后，揭示益生素对雏鸡外周血液免疫功能影响的变化规律及其机理，为益生素的进一步应用提供可靠的科学依据。

试验动物：1 日龄健康广西黄鸡雏鸡 200 只，购于永安融燕禽业饲料有限公司。益生素来源：福建省农业科学院农业生物资源研究所从土壤中筛选出一株对动物肠道病原菌有较强抑制能力的芽胞杆菌，经过中国科学院微生物研究所鉴定为短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2），经发酵、喷雾干燥，制成含活菌量为 10^9CFU/g 的益生素产品。

鸡新城疫病毒毒株和血清：鸡新城疫病毒强毒（F48E9）由福建省农业科学院畜牧兽医研究所保存；鸡新城疫病毒 HI（+）抗体购买自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，批号：99-01。试验试剂： RMPI 1640 培养基，GIBCO BRL 公司产品；ConA，Sigma 公司产品；MTT，Biomol 公司产品；淋巴细胞分离液，上海化学试剂二厂产品；ELX 800UV 型酶标仪（BIO-TEK INSTRUMENT CORPORATION）；96 孔细胞培养板，Coster 公司产品。

鸡新城疫疫苗及免疫时间和途径：鸡新城疫灭活疫苗购于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所[批准文号兽药生字（2005）080012008]。2 周龄雏鸡颈部皮下注射每羽 0.2ml，同时以Ⅱ系弱毒疫苗滴鼻。鸡新城疫病毒强毒增殖和血凝试验：用 SPF 鸡胚增殖，增殖方法及血凝试验参照薛掌林等（2008）。试验设计及动物处理：将 200 只鸡随机分成 4 组，每组 50 只。将益生素产品按 1‰（大剂量组）、0.1‰ （中剂量组）、0.01‰（小剂量组）添加于饲料中（每克饲料含菌量为 10^6CFU/g、10^5CFU/g、10^3CFU/g），在全阶段饲料中添加。以基础饲料为空白对照组。淋巴细胞增殖检测方法：于一免第 0 周、第 1 周、第 3 周、第 4 周采样，每次 5 只。采集无菌抗凝血 2ml，缓慢叠加在等量淋巴细胞分离液上，3000r/min 离心 10min，取中间淋巴细胞层，用 4ml RMPI-1640 不完全培养基洗涤两次，离心后沉淀用 RMPI-1640 完全培养基调节到细胞数为 5×10^6 个/ml，96 孔细胞培养板每孔加淋巴细胞 50μl，10μg/L ConA，40℃培养 45h，每孔 10μl 5mg/ml MTT，继续培养 3h，2000r/min 离心 20min。缓慢倾去上清液，每孔加 150μl 二甲基亚砜，37℃反应 30min，测定 OD_{570}，计算淋巴细胞刺激指数，公式如下：

$$淋巴细胞刺激指数=\frac{试验组OD_{570}-空白OD_{570}}{对照组OD_{570}-空白OD_{570}}$$

血凝抑制试验方法:于一免后第 0 周、第 1 周、第 3 周、第 4 周、第 5 周、第 6 周、第 7 周采样，每次 5 只。在 96 孔 V 型反应板上的第 1 孔加入 50μl 8 个单位抗原，第 2～11 孔加入 50μl 4 个单位抗原，第 12 孔加入 50μl 生理盐水。吸取 50μl 待检血清于第 1 孔内，充分混匀后吸 50μl 于第 2 孔，依此比例稀释至第 10 孔，弃去 50μl；第 11 孔为抗原对照，第 12 孔作为生理盐水对照孔。室温下作用 20min。每孔加入 1%鸽红细胞 50μl，在微量振荡器上摇匀，室温静置 30min 后观察结果。结果判断：以完全抑制 4 个血凝单位病毒抗原的血清最大稀释度作为被检抗原的 H1 价。

1）细胞免疫结果:雏鸡应用益生素后外周血液 T 细胞增殖反应的动态变化见图 7-43。饲喂 0.01‰益生素组，其外周血液 T 淋巴细胞增殖反应与对照组类似，0.1‰和 1‰益生素组，外周血液 T 淋巴细胞增殖反应均高于对照组，以 1‰添加组为最高。当雏鸡饲喂益生素 7d 后，其外周血液 T 细胞增殖反应升高，但统计学差异不显著（$P>0.05$）。饲喂益生素 21～28d 后，外周血液 T 细胞增殖反应显著升高，统计学差异显著（$P<0.05$）。

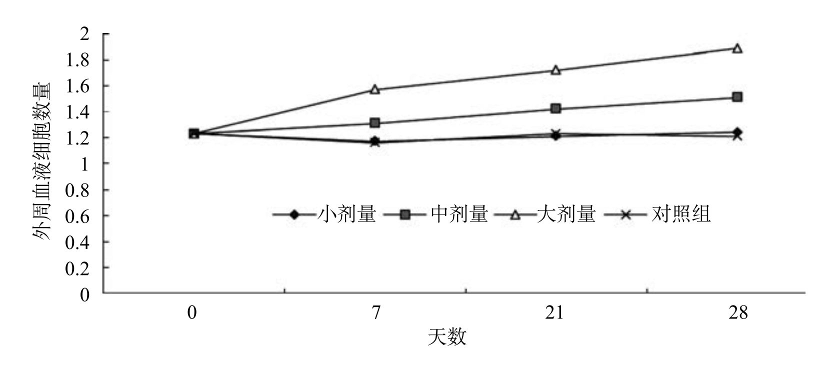


图 7-43　饲喂不同剂量益生素后 T 淋巴细胞增殖反应变化

从表7-55可见，1‰、0.1‰添加组的淋巴细胞刺激指数随时间的延长而升高，1%添加组从起始的1.23上升到28d的1.89±0.04，0.1‰添加组从起始的1.23上升到28d的1.51±0.04，总体水平明显高于对照组，对照组第28天的淋巴细胞刺激指数仅为1.21±0.03；0.001‰添加组的淋巴细胞刺激指数与对照组无明显差异。

表 7-55　不同益生素添加浓度对肉鸡细胞转化反应的影响

组别	淋巴细胞刺激指数			
	OD	7d	21d	28d
1‰	1.23±0.04	1.57±0.07	1.72±0.07	1.89±0.04
0.1‰	1.23±0.04	1.31±0.03	1.42±0.03	1.51±0.04
0.001‰	1.23±0.04	1.17±0.03	1.21±0.04	1.24±0.03
CK	1.23±0.04	1.16±0.01	1.23±0.04	1.21±0.03

2）血凝抑制试验结果：不同剂量益生素和疫苗免疫鸡后抗体效价的变化，以免疫天数为横坐标，抗体平均水平（lg2）为纵坐标建立坐标系，根据检测结果分别绘出不同剂量益生素和疫苗接种后血清抗体水平曲线（图 7-44）。从图 7-44 中可见，各组鸡在接种后第 4～5 天抗体水平开始上升，添加益生素组抗体水平均高于对照组，饲喂 1‰益生素组血液中血凝抑制抗体效价高于其他低剂量组。在接种后第 28 天抗体水平达峰值，随后在接种第 35 天后抗体水平开始下降，至 42d 后抗体消失。

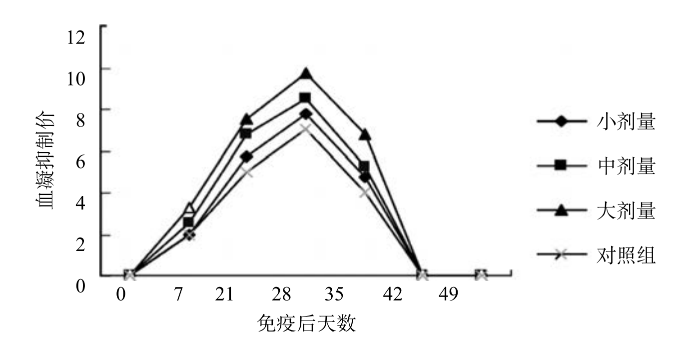


图 7-44　饲喂不同剂量益生素后血液血凝抑制抗体效价变化

表 7-56　不同益生素添加浓度对肉鸡血凝抗体效价的影响

组别	HI 抑制抗体效价（lg2）				
	OD	7d	21d	28d	35d
1‰	0	3.00±0.00	7.25±0.38	9.25±0.38	6.25±0.38
0.1‰	0	2.50±0.50	6.25±0.38	8.50±0.50	5.25±0.75
0.001‰	0	2.00±0.00	6.00±0.00	7.75±0.38	4.75±0.38
CK	0	2.00±0.00	5.50±0.50	7.00±0.00	4.00±0.00

从表 7-56 可见，不同益生素添加剂量组别多时间点的 HI 抗体效价高于同期对照组水平，峰值效价出现在第 28d，由高到低的顺序排列为 1‰添加组（9.25±0.38）>0.1‰添加组（8.50±0.50）>0.001‰添加组（7.75±0.38）>对照组（7.00±0.00）。

淋巴细胞是机体细胞免疫应答的核心。淋巴细胞刺激指数提高表明具有分化、增殖能力的免疫活性细胞数量增多，机体免疫能力增强。研究结果表明，益生菌 1‰、0.1‰添加组的淋巴刺激指数显著高于对照组，说明添加益生菌能提高肉鸡的细胞免疫能力。血凝抑制抗体效价提高说明体液免疫能力增强。研究结果表明，在免疫后第 21d，益生菌添加组的抗体效价均比对照组高 0.5 个滴度；在免疫第 28 天，1‰益生菌添加组的抗体效价比对照组高 2.25 个滴度，可见益生菌对体液免疫具有积极作用，可以促进机体产生良好的免疫效果，增强机体的免疫功能。

研究发现，雏鸡应用益生素，其外周血液 T 细胞对 ConA 的增殖反应高于未应用益生素的对照雏鸡，血清抗体效价也高于未应用益生素的对照雏鸡。表明雏鸡应用益生素后，机体内体液免疫和细胞免疫功能均有所增强。益生素通过诱导免疫细胞合成和分泌 IL-2 增加，促进 T 细胞生长、分化和增殖，使 T 细胞数量增多，功能增强，分泌产生其他各种重要的具有免疫促进作用的细胞因子，进一步促进 T 细胞分化成为 Th 和 CTL 等具有不同功能的效应细胞，从而提高特异性免疫功能。仔猪乳酸杆菌能通过促进某种免疫调节因子的形成起作用，刺激肠道局部型免疫反应，使机体的抗体水平和巨噬细胞活性大大提高，即益生菌可以作为免疫激活剂刺激抗原来提高相应的抗体水平。柴家前等（2001）试验证明，给 1 日龄雏鸡饲喂乳杆菌，在早期可以显著提高鸡消化道分泌型 IgA 抗体的滴度。给断奶仔猪饲喂乳酸杆菌后，接种传染性胃肠炎病毒疫苗，试验组血清中的特异抗体 lgG 水平明显高于对照组。张春杨和牛钟相（2002）研究表明，微生态制剂——生态宝能显著提高蛋鸡血中的新城疫 HI（血凝抑制）抗体水平。潘志明等（2003）试验证明，鸡沙门氏菌弱毒苗与微生态制剂联合应用的免疫保护率达 90%，优于疫苗单独使用的免疫效果。倪耀娣等（2004）通过试验证明，对饲喂微生态制剂的肉仔鸡进行新城疫免疫时，可显著提高新城疫的抗体水平。本试验结果表明，短短芽胞杆菌益生菌（LPF#2）具有提高机体免疫应答水平的作用，将在动物健康养殖方面具有广阔的应用前景。

第五节　微生物发酵床猪病生物防治机理

一、概述

1. 养猪业发展

随着畜牧业生产规模的日益扩大，我国以集约化和规模化为主的畜禽养猪业得到了迅猛发展，为提高城乡居民的生活水平做出了巨大贡献，但是与此同时养猪业也成为农村面源污染的主要来源之一，破坏了生态环境，严重阻碍了养猪业的发展（富相奎和刘娣，2005）。近几年，从日本引进并迅速在中国改进、推广、应用的微生物发酵床养猪技术取得了很大的成效。该技术主要借助于养猪垫料中先导微生物（粪污降解菌）的作

用，利用先导微生物启动垫料发酵，形成以先导菌为优势菌的微生物群落结构，达降解畜禽排泄物，减少污染的目的。许多研究表明（朱洪等，2008；王诚等，2009；沈剑华，2010），发酵床养猪与传统的养猪模式相比，可以在很大程度上改善猪的生活环境，猪疾病的发生情况明显降低，死亡率下降。近年来，在规模化猪场中，猪细菌病的危害愈加严重，在一些免疫抑制疾病发生的地区尤为常见。中国工程院院士陈焕春教授指出当前规模猪场的病毒病趋向缓和，而细菌病呈上升态势（刘春喜等，2008）。其中链球菌、大肠杆菌、巴氏杆菌、副猪嗜血杆菌为 4 种主要细菌病。

2. 微生物发酵床养猪技术简介

发酵床养猪技术是一种零排放的环保养猪技术，是近年来兴起的一种先进的养殖模式，是根据微生态理论和生物发酵理论，采集本地自然环境中的有益微生物，通过对这些微生物的培养和扩增，形成有相当活力的微生物母种，再按照一定的比例将微生物母种、木屑及一定量的其他辅助材料混合、发酵形成有机垫料，将这些有机垫料放入猪舍中，猪从小到大都生活在这种有机垫料上，其排泄物被垫料中的微生物迅速降解、消化，不再需要对猪的排泄物进行人工清理，从而达零排放，减少对环境的污染（张福官等，2010）。其优点在于（沈剑华，2010；赵锦斌和张亚芝，2009；杨群等，2009；孔凡真，2005）：①彻底解决养猪对环境的污染，采用微生物发酵床养猪技术后，由于垫料中含有相当活性的特殊的有益微生物，能迅速有效地降解、消化猪的粪尿排泄物。不再需要每天对猪栏进行清扫和冲洗，没有冲洗猪舍产生的污水，没有任何废弃物排出养猪场，基本上达到了养猪“零污染”的目的。②减少疫病，提高猪肉品质，发酵床养猪技术恢复了生猪供食的自然生活习性，减少应激；且猪舍内通风透气，温湿度均适于猪的生长，猪活动量增大，机体抗病力增强，发病率减少，特别是呼吸道疾病和消化道疾病较传统饲养模式有了大幅度下降，不使用抗生素等药物，提高了猪肉品质。③提高饲料利用率，在饲料中按照一定的比例添加发酵床专用的饲用益生菌，通过相互作用产生代谢物质和蛋白酶、淀粉酶、纤维酶等，同时耗去了肠道内的氧气，给乳酸菌的生长繁殖创造了良好的环境，改善了猪的肠道功能，提高了饲料的转化率。④节工省本、提高效益，由于微生物发酵床养猪技术不需要每天冲洗猪舍、清除猪粪，节省了大量的水源；生猪疫病发生率降低，减少了医药投入；同时采用了自动给食和自动饮水等技术，达到了省工节本的目的。⑤变废为宝，垫料在使用 3～5 年后，形成可以直接用于果树、农作物的生物有机肥，达循环利用、变废为宝的效果。

发酵床养猪技术能有效降低猪疫病的发生，这是因为发酵床养猪技术是通过接种特殊的环境益生菌为先导菌，带动垫料发酵，使垫料中形成以有益菌为优势菌的生物发酵垫料，同时由于发酵床核心发酵层温度高，不断地发酵、分解和杀死病原菌，使有益菌在猪的生长环境中占据了优势地位。实践证明，利用发酵床养猪最大的好处就是给猪在其生长环境中创造了一道益生菌抵抗有害菌的天然防线，提高了生猪的免疫水平，大大降低了发病率和死亡率，保证生猪的健康生长（位孟聪和杨锐，2009；卢立华等，2009；刘卫林和陈长法，2010）。许多研究发现，猪舍的不良环境是许多疾病的诱因，而发酵床技术能够给猪提供一个舒适、干净的生活环境，减少生猪疫病的发生，提高生猪的生产

能力。以典型的免疫抑制病蓝耳病为例，蓝耳病毒在室温及 37℃以下迅速失活，56℃ 45min 即被完全灭活。而在发酵床基质垫层中，其有益功能微生物无论在数量上还是在功能上均占有绝对的优势。有益功能微生物在将粪便发酵分解为菌体蛋白和微量元素的同时，释放大量的热量，因此中心发酵层温度基本维持在 40～60℃ （表层因为基本不发酵或发酵强度很低，常年维持在 20℃左右），这个温度和菌群结构根本不具备蓝耳病毒的生存条件和传播机会（夏飚，2009）。张福官等（2010）在平望镇规模化猪场的发酵床养猪实验中发现，通过在饲料中添加 VT200 有益菌种，可以改变猪消化道内的微生态结构，激活猪体的免疫细胞，增强抗体的免疫应答，提高猪的免疫能力，同时在发酵床垫料中添加 VT1000，形成强势的益生菌群，有害微生物的生长繁殖受到抑制，使猪的生活环境得到净化，减少了猪疾病发生的概率，用药量减少了 60%以上。

3. 微生物发酵床垫料猪细菌病病原种群动态

生猪疫病一直是困扰养猪业的一道难题。许多研究表明，猪舍的不良环境是许多疾病的诱因，只有给猪提供舒适、干净的生活环境才能减少生猪疫病的发生，提高生猪的生产能力。大肠杆菌和沙门氏菌是猪的主要细菌病原，其同属肠杆菌科，在自然界中分布十分广泛。大肠杆菌可分为两类：致病性大肠杆菌和非致病性大肠杆菌，而且血清型比较多；沙门氏菌是一种重要的抗原结构和生化特性相似的人畜共患的肠道病原菌，其血清型也十分繁多（林营志等，2009）。这两种病原菌主要通过消化道感染动物，能够引起生猪及其他动物发生急性、慢性或隐性感染疾病。同时它们也会使人类发生食物中毒。本实验以大肠杆菌和沙门氏菌为病菌靶标，对垫料使用过程中的细菌性病原进行检测，并研究发酵床养殖技术对猪病的生物防治作用。本实验通过发酵床垫料中分离出来的优势菌对大肠杆菌和沙门氏菌的抑制作用，研究发酵床对猪细菌病害的生物防治作用。

二、研究方法

1）培养基和试剂。培养基：伊红美蓝（EMB）琼脂培养基（购自北京陆桥技术有限责任公司），亚硫酸铋（BS）琼脂培养基（购自北京陆桥技术有限责任公司）。试剂：DNA 聚合酶（上海生工生物工程技术服务有限公司），100bp Marker（上海英骏生物技术有限公司）。供试菌株：通过 NA 培养基从 5 批基质垫料中分离的细菌，菌种编号为 FJAT-8344-FJAT-8352、FJAT-8436-FJAT-8442、FJAT-8584- FJAT-8597、FJAT-8841-8860、FJAT-8911-8914、FJAT-10500-FJAT-10522、FJAT-11349-FJAT-11389。以肠道病原菌为靶标筛选对病原菌有拮抗作用的垫料细菌。靶标菌株：Ⅰ为猪大肠杆菌，编号 K88；Ⅱ为沙门氏菌，编号 ATCC 12048（购自福建省微生物研究所）。

2）样品采集与处理。零排放猪舍基质垫料取样于福州新店部队猪场，猪场按照微生物发酵床养猪标准操作规程（凌云和徐亚同，2006）进行垫层配比和相关管理。取样方法：从 3 月起，按照每月一次的频率进行采样，连续采样 5 个月，每次样品分 4 层进行取样（第 1 层 0～20cm ，第 2 层 20～40cm ，第 3 层 40～60cm ，第 4 层 60～80cm），每层分 5 点取样并充分混合后，进行微生物分离。

3）菌种活化。靶标菌株（大肠杆菌、沙门氏菌）的活化：–70℃保存的靶标菌株于

NA 平板上活化，37℃培养 24h。然后挑取一环接种于装瓶量为 1/5 LB 液体培养基中，37℃、170r/min 恒温摇床振荡培养，24h 后取样，用血球计数板计算培养液的菌体浓度，并将菌液浓度调整为 8×10^6 CFU/ml 浓度的孢子悬浮液。供试菌株的活化：−70℃保存的 72 株垫料分离细菌于 NA 平板上活化，30℃培养 24h。然后挑取一环接种于装瓶量为 1/5 LB 液体培养基中，30℃、170r/min 恒温摇床振荡培养，48h 后取样，用血球计数板计算培养液的菌体浓度，并将菌液浓度调整为 8×10^6 CFU/ml 浓度的孢子悬浮液。

4）大肠杆菌和沙门氏菌的分离与培养。称取 10g 混合样品，加入装有 90ml 无菌水的三角瓶中稀释，然后依次稀释成 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 浓度梯度的稀释液。在超净工作台上进行无菌操作，取适当浓度梯度的垫料稀释液，吸取 200μl 均匀涂布，大肠杆菌分离用伊红美蓝特异性培养基，其在伊红美蓝培养基中的菌落形态为圆形、有金属光泽、紫红色至暗紫色（图 7-45 ）。沙门氏菌分离采用亚硫酸铋琼脂特异性培养基，其在亚硫酸铋培养基中的菌落形态为：产 H2S 菌落为黑色或棕褐色，有金属光泽，菌落周围培养基可呈黑色或棕色；不产 H_2S 的菌株形成灰绿色的菌落，周围培养基不变色（图 7-46）。每个菌群做 3 个梯度，每个梯度 3 个重复。处理后倒置于 30℃人工气候箱中培养 1～2d 后，进行计数、纯化并保存。

图 7-45　大肠杆菌在特异性培养基伊红美蓝（EMB）上的菌落形态

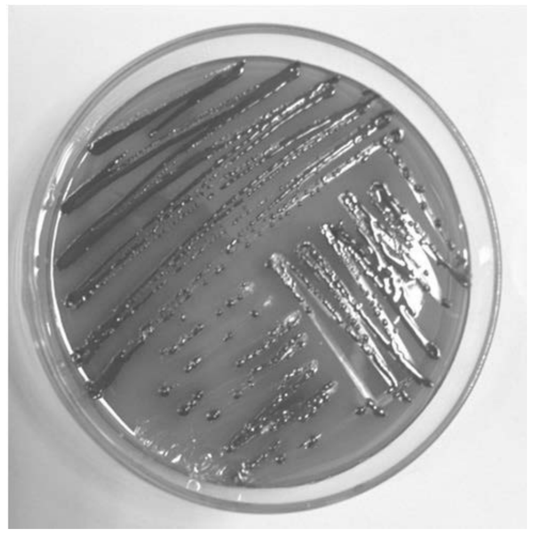


图 7-46　沙门氏菌在特异性培养基亚硫酸铋（SB）上的菌落形态

5）垫料中大肠杆菌和沙门氏菌数量的计算方法。选择一个合适的稀释度，计算每克样品中的活菌数。以每个培养皿 30～300 个菌落为宜。

$$\text{CFU/g} = 平均菌落数\times稀释倍数\times5$$

6）大肠杆菌和沙门氏菌的特异性检测。DNA 模板的制备：将特异性培养基伊红美蓝和亚硫酸铋平板上分离得到的疑似大肠杆菌和沙门氏菌菌株分别在 LB 平板上划线，37℃纯培养 24h。在纯培养的平板上挑取一个菌落，均匀悬浮于装有 50μl 超纯水的离心管中；100℃水浴 10min 后，迅速冰浴 5 min，4℃ 10 000 r/min 离心 1min，取上清于−20℃

保存备用。引物设计：针对大肠杆菌的*LacZ*基因（β-半乳糖苷酶基因）和沙门氏菌*Hut*基因（组氨酸转运操纵子基因）分别设计特异检测引物，引物序列见*LacZ*基因反应体系：25μl体系中包含2.5μl的10×PCR Buffer，0.3μl的10mmol/L的4种dNTP，1μl的10μmol/L的引物，0.3μL（5U/μl）的Taq酶和1μl的DNA模板，加ddH2O补至25μl。PCR反应程序：94℃预变性3min；94℃变性1min，52℃退火30s，72℃ 延伸30s，重复30个循环，最后72℃延伸10min。Hut基因反应体系：25μl体系中包含2.5μl的10×PCR Buffer，0.5μl的10mmol/L的4种dNTP，2μl的10μmol/L的引物，0.2μl（5U/μl）的Taq酶和1μl的DNA模板，加ddH2O补至25μl。PCR反应程序：94℃预变性4min；94℃变性45s，56℃退火45s，72℃ 延伸1 min，重复35个循环，最后72℃延伸10min。PCR产物的检测：取5μl PCR产物，点样于1.5%的琼脂糖凝胶中，以100bp Marker作为标准分子质量，110V电压，电泳45min，EB染色，用凝胶成像系统观察结果。

表7-57引物序列，由上海英俊生物技术有限公司合成。

*LacZ*基因反应体系：25μl体系中包含2.5μl的10×PCR Buffer，0.3μl的10mmol/L的4种dNTP，1μl的10μmol/L的引物，0.3μl（5U/μl）的*Taq*酶和1μl的DNA模板，加ddH_2O补至25μl。PCR反应程序：94℃预变性3min；94℃变性1min，52℃退火30s，72℃ 延伸30s，重复30个循环，最后72℃延伸10min。*Hut*基因反应体系：25μl体系中包含2.5μl的10×PCR Buffer，0.5μl的10mmol/L的4种dNTP，2μl的10μmol/L的引物，0.2μl（5U/μl）的*Taq*酶和1μl的DNA模板，加ddH_2O补至25μl。PCR反应程序：94℃预变性4min；94℃变性45s，56℃退火45s，72℃ 延伸1 min，重复35个循环，最后72℃延伸10min。PCR产物的检测：取5μl PCR产物，点样于1.5%的琼脂糖凝胶中，以100bp Marker作为标准分子质量，110V电压，电泳45min，EB染色，用凝胶成像系统观察结果。

表7-57　引物序列

扩增基因	引物名称	碱基序列	片段/bp
LacZ	LacZ -1	5′-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3′	260
	LacZ -2	5′-GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA-3′	
Hut	Hut -1	5′ -ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGCT- 3′	495
	Hut -2	5′-ATGTTGTCCTGCCCCTGGTAAGAGA- 3′	

7）抑菌圈法测定。参照葛慈斌等（2009）的文献。

8）优势种的确定。优势种是对群落影响最大的物种，决定群落的外形、结构和功能。传统方法是根据相对密度、相对生物量或者出现率，定义密度优势种、生物量优势种或者出现率优势种。重要值（IV）=（相对密度+相对生物量+相对频度）/3。

相对密度（%）=某种细菌的平均密度/各种细菌的密度和×100%

相对生物量（%）=某种细菌的数量/各种细菌的数量和×100%

相对频度（%）=某种细菌的出现频率/各种细菌的出现频率和 ×100%

三、微生物发酵床大肠杆菌种群的空间分布动态

从不同使用时间、不同层次的基质垫层中共分离得到 189 株疑似大肠杆菌，经大肠杆菌特异性引物检测，结果见图 7-47，大肠杆菌菌株可以扩增出一条约 260bp 的条带，而清水对照和非大肠杆菌的菌株中没有扩增出条带。经鉴定，分离的 189 株疑似大肠杆菌中 170 株为阳性，阳性率为 90.0%，分别为第 1 个月分离 28 株，经鉴定 24 株为阳性；第 2 个月分离 58 株，经鉴定 49 株为阳性；第 3 个月分离 48 株，经鉴定 48 株为阳性；第 4 个月分离 40 株，经鉴定 35 株为阳性；第 5 个月分离 15 株，经鉴定 14 株为阳性。

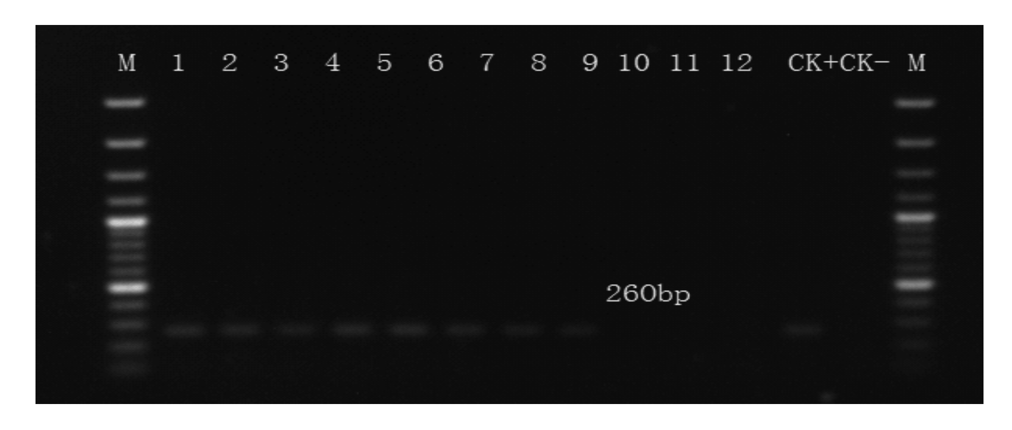


图 7-47　大肠杆菌特异检测图谱

1～9 为大肠杆菌阳性检测；10～12 为大肠杆菌阴性检测；CK+为阳性对照；CK−为阴性对照；M 为分子质量标记

在基质垫层中大肠杆菌时空动态分布见图 7-48，其数量变化趋势与真菌相似，随着垫料使用时间的增加，大肠杆菌的数量逐渐减少，第 1 个月垫料表层的大肠杆菌分布数量最多，达 3.33×10^6CFU/g；到第 2 个月，垫料里层大肠杆菌的分布数量达最大值，第 2 层、第 3 层和第 4 层的大肠杆菌数量分别为 1.45×10^6CFU/g、5.00×10^5CFU/g、8.00×

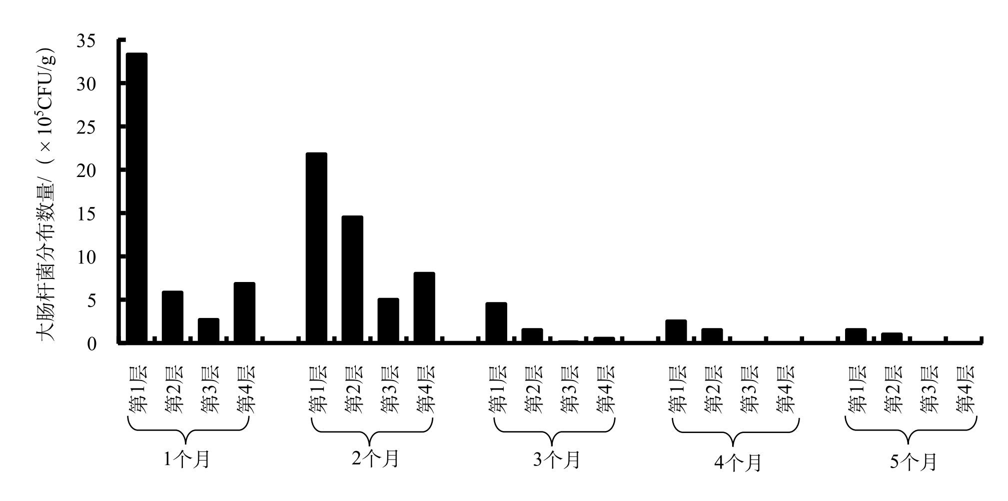


图 7-48　微生物发酵床养猪猪舍基质垫层大肠杆菌的分布动态

10^5CFU/g。这可能是因为基质垫层中本身并没有大肠杆菌的存在，垫料中的大肠杆菌主要来自仔猪的粪便，使垫料里层的大肠杆菌分布数量的增加略滞后于表层。从不同层次上看，大肠杆菌主要分布在垫料表层，里层的分布量较少。从第 3 个月开始大肠杆菌数量明显下降，使用 4 个月后，在垫料的第 3 层和第 4 层几乎分离不到大肠杆菌，这也说明垫料的使用可以很好地抑制大肠杆菌的生长。

四、微生物发酵床沙门氏菌种群的空间分布动态

从不同使用时间、不同层次的基质垫层中共分离到 209 株疑似沙门氏菌，经沙门氏菌特异性引物鉴定，结果见图 7-49 ，这对特异性引物在沙门氏菌菌株中扩增出一条约 495bp 的条带，而在非沙门氏菌和清水对照中没有扩增出条带。经鉴定，分离的 209 株疑似沙门氏菌中有 85 株为阳性，阳性率为 40.7%，其中第 1 个月分离沙门氏菌 43 株经鉴定 13 株为阳性，第 2 个月分离 41 株经鉴定 15 株为阳性，第 3 个月分离 49 株经鉴定 26 株为阳性，第 4 个月分离 41 株经鉴定 15 株为阳性，第 5 个月分离 35 株经鉴定 16 株为阳性。

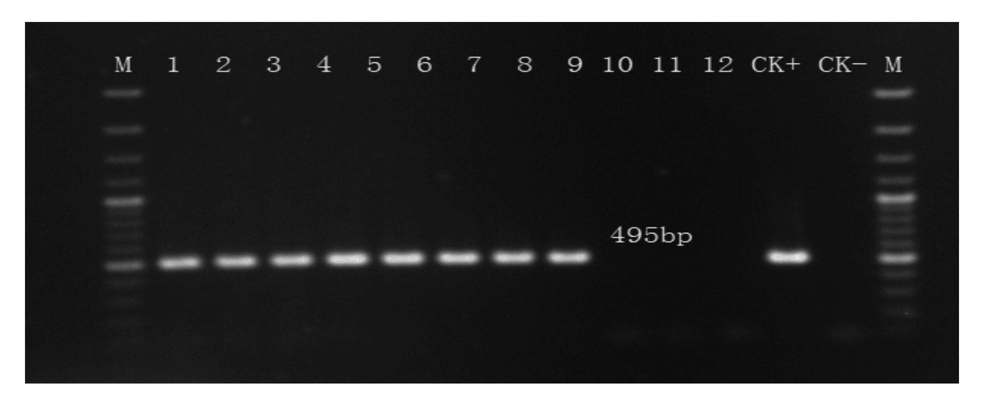


图 7-49　沙门氏菌特异检测图谱

1～9 为沙门氏菌阳性检测；10～12 为沙门氏菌阴性检测；CK+为阳性对照；CK−为阴性对照；M 为分子质量标记

基质垫料中沙门氏菌的时空分布动态见图 7-50，其变化规律与细菌相似，呈现先上升后下降的趋势，垫料使用的第 3 个月沙门氏菌的分布数量达最大值。从第 4 个月开始，沙门氏菌的分布数量显著减少，第 5 个月垫料中分离的沙门氏菌比第 1 个月减少 60.3%～89.6%。从空间上来看，沙门氏菌主要分布在垫料表层，里层较少。这可能是由于垫料表层的通气量较好，而且温度为 30～35℃，接近沙门氏菌的最适生长温度 37℃。

五、微生物发酵床微生物种群与猪病原菌相关性分析

基质垫层中微生物数量及种群分布与垫层有机物质成分和含量、微生物间的相互作用等多种因素密切相关。大肠杆菌病和沙门氏菌病是养猪业的主要细菌性病害，在基质垫层病害检测中，可以用大肠杆菌和沙门氏菌作为指示菌，当其在基质垫料中大量存在时，表明其他病原微生物也存在。其分布数量除了与基质垫料中的 C 源、N 源等营养物

质，以及温度、湿度、pH 等环境因素有关外，也与基质垫层中微生物之间的相互作用密切相关（刘涛刁等，2008）。本实验以每种菌的分布数量和微生物总量的比值作为其相对含量。以大肠杆菌、沙门氏菌与基质垫层中细菌、真菌、放线菌的相对含量进行相关性分析。

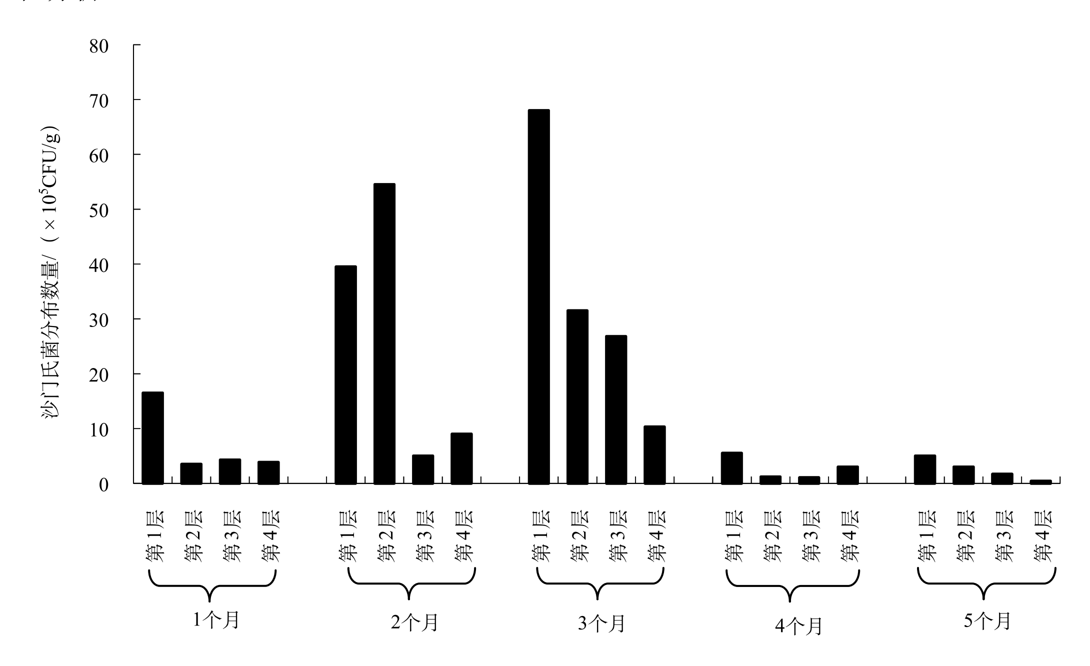


图 7-50　微生物发酵床养猪猪舍基质垫层沙门氏菌的分布动态

表 7-58 表明，大肠杆菌的相对含量与细菌呈显著的负相关（r=–0.47），而与放线菌呈显著正相关（r=0.48）。沙门氏菌的相对含量与细菌呈极显著的负相关（r=–0.62），与真菌（r=0.67）和放线菌（r=0.58）呈极显著正相关。说明在基质垫料中细菌数量多时，可以更好地抑制大肠杆菌和沙门氏菌等病原微生物的生长。而且细菌是降解有机物和产热的主要微生物，细菌的大量分布，也有利于提高基质垫层的温度，使垫料保持在较高的温度（55～65℃），从而更好地抑制病原微生物的生长。

表 7-58　基质垫层中大肠杆菌和沙门氏菌与细菌、真菌、放线菌分布数量的相关性分析

相关系数	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
X_1 大肠杆菌	1.00				
X_2 沙门氏菌	0.01	1.00			
X_3 垫料细菌	–0.47*	–0.62**	1.00		
X_4 垫料真菌	0.27	0.67**	–0.79**	1.00	
X_5 垫料放线菌	0.48*	0.58**	–0.99**	0.72**	1.00

*表示显著相关（P<0.05），** 表示极显著相关（P< 0.01）

六、微生物发酵床芽胞杆菌优势种确定

对每个月的优势菌测定结果见表 7-59。在第 1 个月，其优势菌为短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）、乳微杆菌（*Microbacterium lacticum*）、短状杆菌（*Brachybacterium zhongshanense*）和琼氏不动杆菌（*Acinetobacter junii*）。第 2 个月，原玻璃蝇节杆菌（*Arthrobacter protophormiae*）大量生长，成为最大的优势菌。此外，醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）、短短芽胞杆菌仍然占有重要的优势地位。第 3 个月，鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium* sp.）增加，与短单胞菌（*Brachymonas chironomi*）和短短芽胞杆菌共同构成了基质垫层的优势菌群，第 4 个月和第 5 个月，垫料中的优势菌

表 7-59　每个月垫料细菌优势种及重要值

使用时间	菌种名称		相对生物量	相对密度	相对频度	重要值（Ⅳ）
1 个月	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	34.86	8.72	14.81	19.46
	Microbacterium lacticum	乳微杆菌	14.95	3.74	7.41	8.70
	Brachybacterium zhongshanense	短状杆菌	10.02	2.51	11.11	7.88
	Acinetobacter junii	琼氏不动杆菌	14.65	3.66	3.70	7.34
	Microbacterium sp.	微杆菌属	10.68	2.67	3.70	5.68
	Bacillus subtilis	枯草芽胞杆菌	1.62	0.40	11.11	4.38
	Acinetobacter towneri	不动杆菌属	6.28	1.57	3.70	3.85
	B. cereus	蜡状芽胞杆菌	0.31	0.08	11.11	3.83
	Microbacterium arabinogalactanolyticum	解阿拉伯半乳聚糖微杆菌	0.21	0.05	11.11	3.79
	Gordonia cholesterolivorans	戈登氏菌属	4.19	1.05	3.70	2.98
	Klebsiella pneumoniae	肺炎克雷伯斯氏菌	0.07	0.02	7.41	2.50
	Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	2.09	0.52	3.70	2.11
	Ralstonia pickettii	青枯雷尔氏菌	0.06	0.01	3.70	1.26
	B. megatherium	巨大芽胞杆菌	0.01	0.00	3.70	1.24
2 个月	*Arthrobacter protophormiae*	原玻璃蝇节杆菌	32.26	8.06	13.79	18.04
	Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	26.24	6.56	13.79	15.53
	Brevibacillus brevis	短短芽胞杆菌	15.34	3.84	13.79	10.99
	Microbacterium lacticum	乳微杆菌	3.43	0.86	13.79	6.03
	Comamonas kersterii	丛毛单胞菌属	6.10	1.53	10.34	5.99
	Corynebacterium efficiens	棒状杆菌属	5.93	1.48	10.34	5.92
	Ochrobactrum sp.	苍白杆菌属	7.02	1.75	6.90	5.22
	Comamonas testosteroni	睾丸酮丛毛单胞菌	0.84	0.21	6.90	2.65
	Acinetobacter lwoffii	鲁氏不动杆菌	2.59	0.65	3.45	2.23
	Bacillus subtilis	枯草芽胞杆菌	0.17	0.04	3.45	1.22
	Serratia marcescens	粘质沙雷氏菌	0.08	0.02	3.45	1.18

续表

使用时间	菌种名称		相对生物量	相对密度	相对频度	重要值(Ⅳ)
3 个月	*Sphingobacterium* sp.	鞘氨醇杆菌属	43.25	10.81	14.29	22.78
	Brachymonas chironomi	短单胞菌	40.96	10.24	14.29	21.83
	Brevibacillus brevis	短短芽胞杆菌	12.03	3.01	14.29	9.77
	Rhodococcus pyridinivorans	红球菌	1.86	0.47	10.71	4.35
	Arthrobacter nicotianae	烟草节杆菌	0.57	0.14	10.71	3.81
	Acinetobacter towneri	不动杆菌属	0.14	0.04	7.14	2.44
	Bacillus subtilis	枯草芽胞杆菌	0.18	0.05	3.57	1.27
	Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	0.14	0.04	3.57	1.25
	Arthrobacter protophormiae	原玻璃蝇节杆菌	0.14	0.04	3.57	1.25
	B. cereus	蜡状芽胞杆菌	0.14	0.04	3.57	1.25
	B. megatherium	巨大芽胞杆菌	0.14	0.04	3.57	1.25
	B. flexus	弯曲芽胞杆菌	0.14	0.04	3.57	1.25
	Paneibacillus polymyxa	多粘芽胞杆菌	0.14	0.04	3.57	1.25
	Paracoccus aminovorans	噬氨副球菌	0.14	0.04	3.57	1.25
4 个月	*Microbacterium* sp.	微杆菌属	55.38	13.84	15.38	28.20
	Brevibacillus brevis	短短芽胞杆菌	17.93	4.48	15.38	12.60
	Bacillus subtilis	枯草芽胞杆菌	5.18	1.29	15.38	7.29
	Staphylococcus gallinarum	鸡葡萄球菌	9.96	2.49	7.69	6.71
	B. licheniformis	地衣芽胞杆菌	2.39	0.60	11.54	4.84
	B. amyloliquefaciens	解淀粉芽胞杆菌	1.20	0.30	7.69	3.06
	Stenotrophomonas maltophilia	嗜麦芽寡养单胞菌	3.19	0.80	3.85	2.61
	Sphingobacterium sp.	鞘氨醇杆菌属	1.99	0.50	3.85	2.11
	Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	0.80	0.20	3.85	1.61
	B. cereus	蜡状芽胞杆菌	0.80	0.20	3.85	1.61
	B. megatherium	巨大芽胞杆菌	0.40	0.10	3.85	1.45
	Burkholderiales bacterium	伯克霍尔德氏菌属	0.40	0.10	3.85	1.45
	Enterobacter sp.	肠杆菌属	0.40	0.10	3.85	1.45
5 个月	*Microbacterium barkeri*	巴氏微杆菌	58.85	14.71	11.11	28.23
	Brevibacillus brevis	短短芽胞杆菌	20.17	5.04	22.22	15.81
	Bacillus subtilis	枯草芽胞杆菌	8.54	2.14	22.22	10.97
	B. cereus	蜡状芽胞杆菌	2.37	0.59	16.67	6.54
	Staphylococcus epidermidis	表皮葡萄球菌	5.79	1.45	5.56	4.26
	Pseudomonas alcaligenes	产碱假单胞菌	0.24	0.06	11.11	3.80
	Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	3.56	0.89	5.56	3.34
	B. flexus	弯曲芽胞杆菌	0.47	0.12	5.56	2.05

为微杆菌（*Microbacterium* sp.）、枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）和短短芽胞杆菌，由此可见，在垫料的使用过程中枯草芽胞杆菌和短短芽胞杆菌能够始终保持其重要的优势菌地位，其中短短芽胞杆菌是最重要的优势菌，该菌是发酵床技术添加的环境益生菌，其在基质垫料中可以始终保持其优势菌的地位，形成稳定的微生物群落（表 7-60）。

表 7-60　垫料 5 个月使用过程中优势菌菌名及重要值

菌种名称		相对生物量	相对密度	相对频率	重要值（Ⅳ）
Brevibacillus brevis	短短芽胞杆菌	18.91	0.95	15.63	11.83
Microbacterium sp.	微杆菌	11.36	0.57	3.91	5.28
Sphingobacterium sp.	鞘氨醇杆菌	10.77	0.54	3.91	5.07
Acinetobacter calcoaceticus	醋酸钙不动杆菌	8.26	0.41	6.25	4.97
Brachymonas chironomi	短状杆菌	9.87	0.49	3.13	4.50
Arthrobacter protophormiae	原玻璃蝇节杆菌	8.92	0.45	3.91	4.42
Bacillus subtilis	枯草芽胞杆菌	2.50	0.12	10.16	4.26
Microbacterium barkeri	巴氏微杆菌	8.56	0.43	1.56	3.52
Microbacterium lacticum	乳微杆菌	3.41	0.17	4.69	2.76
B. cereus	蜡状芽胞杆菌	0.57	0.03	6.25	2.28
Comamonas kersterii	丛毛单胞菌	1.68	0.08	2.34	1.37
Brachybacterium zhongshanense	短状杆菌	1.65	0.08	2.34	1.36
Corynebacterium efficiens	棒状杆菌	1.63	0.08	2.34	1.35
Ochrobactrum sp.	苍白杆菌	1.93	0.10	1.56	1.20
Staphylococcus gallinarum	鸡葡萄球菌	1.73	0.09	1.56	1.12
Acinetobacter junii	琼氏不动杆菌	2.42	0.12	0.78	1.11

七、微生物发酵床芽胞杆菌对大肠杆菌和沙门氏菌的抑制效应

用抑菌圈法分别对微生物发酵床基质垫层中分离的 74 株细菌，进行大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌实验，实验结果见图 7-51～图 7-54 和表 7-61，表 7-62，这 72 株细菌中对大肠杆菌有抑菌作用的菌株有 9 种细菌，分别为枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）、弯曲芽胞杆菌（*B. flexus*）、短短芽胞杆菌（*B. brevis*）、肺炎克雷伯斯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）、粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescen*s）、噬氨副球菌（*Paracoccus aminovorans*）、鸡葡萄球菌（*Staphylococcus gallinarum*）、睾丸酮丛毛单胞菌（*Comamonas testosteroni*）、丛毛单胞菌（*Comamonas kersterii*）。其中抑菌效果最好的是枯草芽胞杆菌和短短芽胞杆菌，其抑菌圈直径分别为 31.13mm 和 29.89mm，对沙门氏菌有抑菌效果的菌株有肺炎克雷伯斯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）、粘质沙雷氏菌、鸡葡萄球菌、短短芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌。其中抑菌效果最好的是肺炎克雷伯斯氏菌，抑菌圈直径为 21.56 mm。短短芽胞杆菌作为微生物发酵床技术使用的益生菌，在基质垫料中始终保持其优势菌的地位，对大肠杆菌和沙门氏菌的抑制起主要作用。

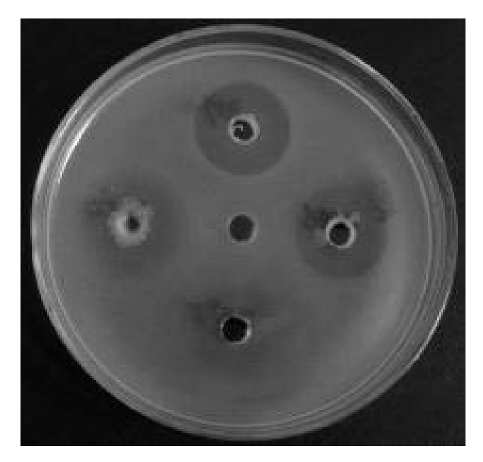


图 7-51　部分垫料细菌对大肠杆菌 K88 的抑菌圈

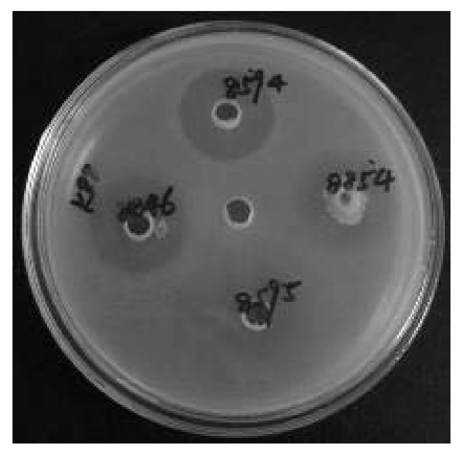


图 7-52　部分垫料微生物对大肠杆菌 K88 的抑菌圈

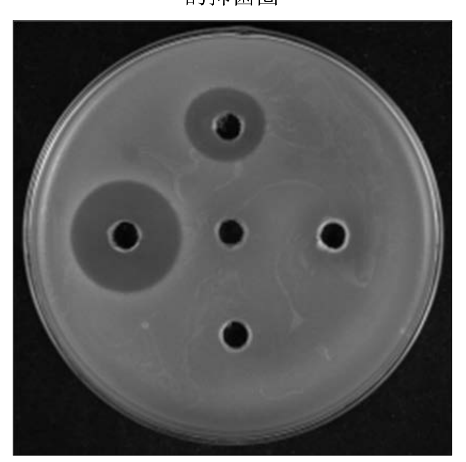


图 7-53　部分垫料微生物对沙门氏菌 FJAT-8720 的抑菌圈

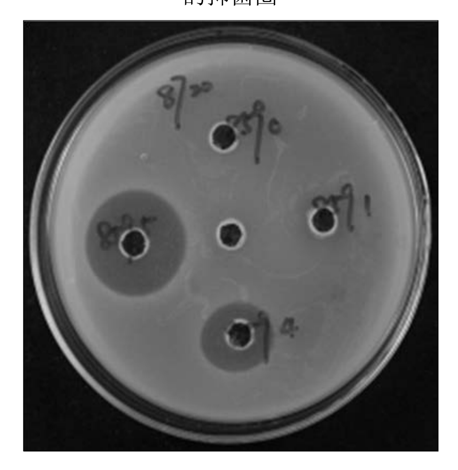


图 7-54　部分垫料微生物对沙门氏菌 FJAT-8720 的抑菌圈

表 7-61　对大肠杆菌 K88 有抑菌作用的菌株及抑菌圈大小

属名	细菌名称		抑菌圈/mm
芽胞杆菌属（*Bacillus*）	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	31.13
	Bacillus flexus	弯曲芽胞杆菌	19.82
短芽胞杆菌属（*Brevibacillus*）	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	29.89
克雷伯斯氏菌属（*Klebsiella*）	*Klebsiella pneumoniae*	肺炎克雷伯斯氏菌	21.33
沙雷氏菌属（*Serratia*）	*Serratia marcescens*	粘质沙雷氏菌	17.1
副球菌属（*Paracoccus*）	*Paracoccus aminovorans*	噬氨副球菌	16.44
葡萄球菌属（*Staphylococcus*）	*Staphylococcus gallinarum*	鸡葡萄球菌	11.66
丛毛单胞菌属（*Comamonas*）	*Comamonas testosteroni*	睾丸酮丛毛单胞菌	14.63
	Comamonas kersterii	丛毛单胞菌属	12.7

表 7-62　对沙门氏菌 FJAT-8720 有抑菌作用的菌株及抑菌圈大小

属名	细菌名称		抑菌圈/mm
克雷伯斯氏菌属（*Klebsiella*）	*Klebsiella pneumoniae*	肺炎克雷伯斯氏菌	21.56
沙雷氏菌属（*Serratia*）	*Serratia marcescens*	粘质沙雷氏菌	19.23
葡萄球菌属（*Staphylococcus*）	*Staphylococcus gallinarum*	鸡葡萄球菌	18.83
短芽胞杆菌属（*Brevibacillus*）	*Brevibacillus. brevis*	短短芽胞杆菌	15.94
芽胞杆菌属（*Bacillus*）	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	15.32

八、讨论

基质垫料中含有大量的微生物，其中包括病原微生物。大肠杆菌和沙门氏菌是引起生猪疫病的主要病原菌，它们同属肠杆菌科，在自然界分布十分广泛（Mcdaniels and Rice, 1996），研究微生物发酵床养猪技术中大肠杆菌和沙门氏菌的分布动态具有重要的意义。环境中病原微生物一般都不耐热，李国学等（1995）以鸡粪或牛粪为原料进行堆肥，在堆肥系统中初期大肠杆菌数量很高，每克样品中达 10^5～10^6 数量级，但在高温期（可达65℃）及高温期后总大肠杆菌数降为 0（Gong *et al*., 2005）。本实验发现，微生物发酵床养猪基质垫层有一定量的大肠杆菌和沙门氏菌分布，分布数量分别在 1.00×10^4～3.33×10^6CFU/g 和 4.00×10^4～6.80×10^6CFU/g，远小于猪粪便大肠杆菌和沙门氏菌的分布数量（10^8CFU/g）。从垫料的空间分布上看，大肠杆菌和沙门氏菌主要分布在垫料表层，而且随着垫料使用时间的增加，逐渐减少。从第 3 个月开始大肠杆菌数量开始明显下降，4 个月后，在垫料的第 3 层和第 4 层几乎分离不到大肠杆菌。沙门氏菌的数量呈现先上升后下降的趋势，第 3 个月其分布数量达最大值，然后逐渐减少，并最终保持在一个极低的水平，在第 5 个月，垫料中的沙门氏菌数量比第 1 个月减少 60.3%～89.6%。表明微生物发酵床能形成以有益微生物为优势菌的生物保护屏障，阻止有害微生物的侵入；能有效抑制大肠杆菌和沙门氏菌的生长，从而对猪舍大肠杆菌病原和沙门氏菌病原起到生防作用，且微生物发酵床使用一定时间后，生防效果更为明显。

从垫料微生物群落动态、脂肪酸生物标记和病原菌相关性分析发现，大肠杆菌的相对含量与细菌呈显著的负相关（$r=-0.47$），而与放线菌呈显著正相关（$r=0.48$）。沙门氏菌的相对含量与细菌呈极显著的负相关（$r=-0.62$），与真菌（$r=0.67$）和放线菌（$r=0.58$）呈极显著正相关。这说明在基质垫料中细菌数量多而真菌和放线菌数量少时，能更好地抑制病原菌的生长。PLFA 总量与基质垫层中大肠杆菌的数量具有显著的相关性，相关系数为 0.47*（$P<0.05$），与沙门氏菌的数量分布没有明显的相关性，基质垫层中微生物脂肪酸生物量可以影响到大肠杆菌的生长，PLFA 总量高的，大肠杆菌的数量也多；而沙门氏菌的分布数量与 PLFA 总量关系不大。

在微生物发酵床基质垫层这个微生态系统中，动物体内固有的微生物菌群、微生物饲料添加剂，垫料中添加的环境益生菌和垫料中生长的微生物菌群，组成了动物体（猪）内外的微生态系统。对垫料细菌经 16S rDNA 基因扩增和序列测定结果表明，72 株细菌

分属于细菌域的 4 个门类（Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes），20 个科，22 个属（*Acinetobacter*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Brachybacterium*、*Brachymonas*、*Brevibacillus*、*Burkholderiales*、*Comamonas*、*Corynebacterium*、*Gordonia*、*Klebsiella*、*Microbacterium*、*Ochrobactrum*、*Paneibacillus*、*Paracoccus*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Rhodococcus*、*Serratia*、*Sphingobacterium*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*）。在垫料使用前后，其群落差异较大，在垫料使用的第 1 个月和第 2 个月，没有拟杆菌门细菌，分离出来的细菌分属于放线菌门、厚壁菌门和变形菌门，第 4 个月无放线菌门细菌，第 5 个月无拟杆菌门细菌，而厚壁菌门和变形菌门在垫料使用的整个过程中都有检测到。其中短短芽胞杆菌是最主要的优势菌，其作为微生物发酵床技术添加的环境益生菌，在基质垫层中能够始终存在，形成稳定的菌落，并保持绝对的优势菌地位。

微生物发酵床垫料细菌对大肠杆菌和沙门氏菌有抑制作用，其中起主要抑制作用的是芽胞杆菌属的细菌，尤其是短短芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌，说明微生物发酵床能够有效地抑制垫料中病原微生物的生长，对生猪疫病起到生物防治作用。

第六节　芽胞杆菌环境益生菌的作用机理

一、概述

在微生物发酵床基质垫层这个微生态系统中，动物体内固有的微生物菌群、微生物饲料添加剂、垫料添加的环境益生菌和垫料中生长的微生物菌群，组成了动物体（猪）内外的微生态系统，增加了微生态环境中的生物多样性，有利于生态系统的稳定、和谐、健康和发展。在这个微生态系统中，细菌是复杂有机物、矿质元素转化和粪尿分解的最重要的贡献者，其多样性研究对于全面了解垫料生态系统及其安全健康状况尤为重要。目前对微生物多样性的研究主要有以下 4 种：①传统的微生物平板纯培养方法；②Biolog 分析法；③磷脂脂肪酸分析法（PLFA）；④分子生物学方法。本实验通过传统的稀释平板法，对基质垫料使用过程中，不同时间不同层次的细菌进行分离鉴定，研究养猪发酵床垫料细菌群落的多样性。

二、研究方法

1. 培养基和试剂

NA 培养基：牛肉浸膏 3.0g/L、蛋白胨 5.0g/L、葡萄糖 10.0g/L、琼脂 17.0g/L，pH7.2；PDA 培养基：马铃薯 200.0g/L、葡萄糖 20.0g/L、琼脂 17.0g/L；高氏一号培养基：可溶性淀粉 20.0g/L、NaCl 0.5g/L、KNO_3 1.0g/L、$K_2HPO_3\cdot 3H_2O$ 0.5g/L、$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.5g/L、$FeSO_4\cdot 7H_2O$ 0.01g/L、琼脂 17.0g/L，pH7.4～7.6。LB 培养基：酵母浸膏 5.0g/L、蛋白胨 10.0g/L、NaCl 10.0g/L，pH7.0。试剂：DNA 聚合酶（上海生工生物工程技术服务有限公司），Wizard®DNA 提取试剂盒（上海英骏生物技术有限公司），链霉素，高锰酸钾，100bp Marker（上海英骏生物技术有限公司）。供试菌株：通过 NA 培养基从 5 批基质垫料中分离的细菌，菌种编号：FJAT-8344-FJAT-8352、FJAT-8436-FJAT-8442、

FJAT-8584-FJAT-8597、FJAT-8841-8860、FJAT-8911-8914、FJAT-10500-FJAT-10522、FJAT-11349-FJAT-11389。

2. 样品采集与处理

零排放猪舍基质垫料取样于福州新店部队猪场，猪场按照微生物发酵床养猪标准操作规程进行垫层配比和相关管理。取样方法：从 3 月起，按照每月一次的频率进行采样，连续采样 5 个月，每次样品分 4 层进行取样（第 1 层 0～20cm ，第 2 层 20～40cm ，第 3 层 40～60cm ，第 4 层 60～80cm），每层分 5 点取样并充分混合后，进行微生物分离。

3. 微生物的分离与培养

采用稀释涂板法进行微生物分离，每层混合样品分别称取 10g，加入装有 90ml 无菌水的三角瓶中稀释，充分振荡均匀后，即配成 10^{-1} 浓度的垫料悬浮液原液，吸取 1ml 原液至装有 9ml 无菌水的试管中稀释，按 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 浓度梯度稀释原液，制备成不同浓度梯度的垫料悬浮液。在超净工作台上进行无菌操作，取适当浓度梯度的垫料稀释液，吸取 200μl 均匀涂布，细菌分离采用 NA 培养基，真菌用 PDA 培养基+链霉素，放线菌用高氏一号培养基+重铬酸钾。每个菌群做 3 个梯度，每个梯度 3 个重复。处理后倒置于 30℃人工气候箱中培养，细菌培养 1～2d，真菌和放线菌培养 3～5d 后，根据菌落形态、色泽、边缘状态、表面干湿状态等特征，进行计数、纯化和保存。

4. 垫料中各种微生物的数量计算方法：

采用涂抹平板分离法培养的微生物在计算结果时，常按下列标准从接种后的 3 个稀释度中，选择一个合适的稀释度，计算每克样品中的活菌数。同一稀释度各个重复的菌数相差不太悬殊；细菌、放线菌以每个培养皿 30～300 个菌落为宜，真菌以每皿 10～100 个菌落为宜。

$$\text{CFU/g} = \text{平均菌落数} \times \text{稀释倍数} \times 5$$

5. 菌株 DNA 提取

活化菌株：–70℃保存的 72 株垫料分离细菌于 NA 平板上活化，30℃培养 24h。然后挑取纯培养平板上的单菌落到 LB 液体培养基（20ml/150ml）中 37℃，170r/min 过夜培养（12～18h）。按照 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 试剂盒操作步骤提取细菌 DNA，–20℃保存备用。

6. PCR 鉴定

PCR 扩增引物为细菌通用引物（Tiquia *et al*., 2002）：16S1：5′- AGAGTTT GATCCTGGCTCAG -3′，16S2：5′- GGTTACCTTGTTACGACTT -3′。PCR 反应程序：94℃预变性 5min；94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 1.5min，重复 30 个循环，最后 72℃延伸 10min。PCR 产物的检测：取 5μl PCR 产物，点样于 1.5%的琼脂糖凝胶中，以 100bp Marker 作为标准分子质量，110V 电压，电泳 45min，EB 染色，用凝胶成像系统观察结果。

7. 16S rDNA 序列分析

将 PCR 产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。测序结果中每个样品的双向序列用 DNAman version 6.0 软件中 Sequence Assembly 进行拼接并输出全序列，将获得的序列与 GenBank 核酸序列数据库进行同源序列比对分析。

三、微生物发酵床细菌数量变化

垫料使用过程中细菌数量变化见图 7-55，基质垫层中细菌的分布数量最大，是降解有机物和产热的主要微生物，可以达 10^8 数量级。随着垫料使用时间的增加，基质垫层中细菌数量呈现先上升后下降的趋势，这可能是因为在垫料使用的早期，新鲜的垫料中 C 源和 N 源等营养成分含量较高，使垫料中细菌群落数量呈现一个较快的上升趋势，随着使用时间的增加，垫层中微生物生长所必需的 C 源和 N 源等营养成分含量降低，限制细菌的生长。

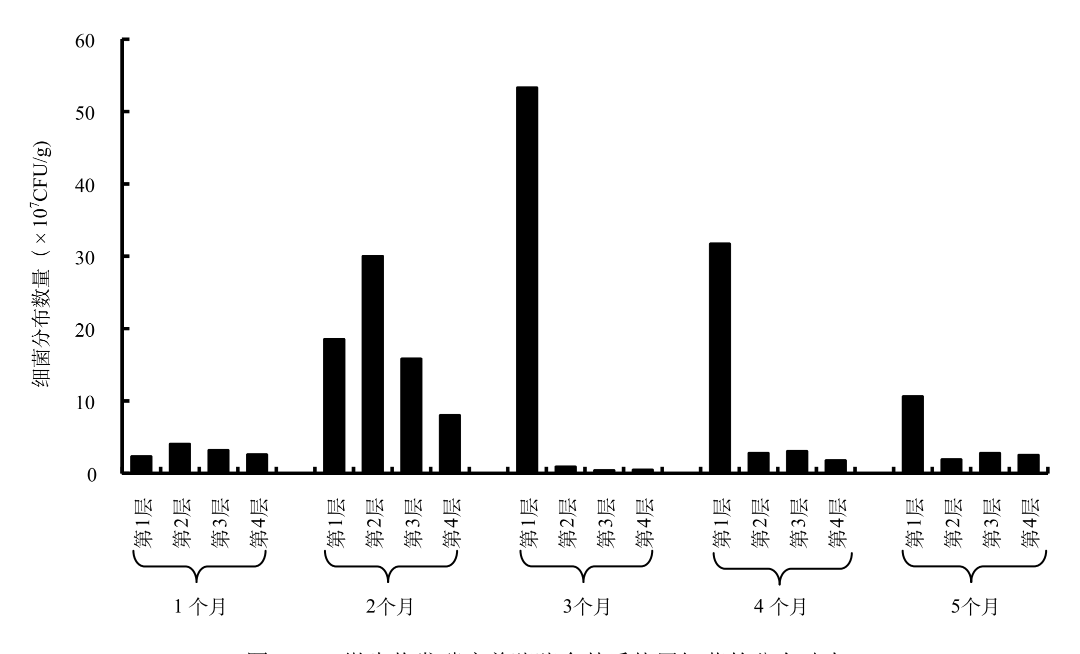


图 7-55　微生物发酵床养猪猪舍基质垫层细菌的分布动态

在调查中发现，垫料表层细菌数量峰值出现在第 3 个月，达 3.17×10^8CFU/g，而第 2 层、第 3 层和第 4 层细菌数量峰值则出现在第 2 个月，分别达 3.00×10^8CFU/g、1.58×10^8CFU/g、8.00×10^7CFU/g。从空间上看，垫料表层的细菌数量高于垫料里层，在垫料使用的第 1 个月，不同层次的细菌分布数量差别不大，从第 2 个月开始，表层的细菌数量显著增加，到第 3 个月，垫料表层的细菌分布数量甚至比里层高出 3 个数量级。

四、微生物发酵床真菌数量变化

垫料使用过程中真菌数量变化见图 7-56，垫料中真菌的分布数量为 10^4～10^5 数量级，

比细菌低而与放线菌相似（朱红等，2007）。随着垫料使用时间的增加，基质垫层真菌数量逐渐减少，垫料使用 5 个月后，垫料中不同层次的真菌分布数量均比第 1 个月减少了 90%以上。这可能是由于垫料发酵底物是以纤维素和木质素为主要成分的谷壳和锯末，垫料使用初期真菌数量较多可能是由于垫料中存在纤维素和木质素（蓝江林等，2010）。随着使用时间的增加，真菌数量逐渐减少，这可能是由于在垫料里层温度较高（55～65℃），而大部分真菌在温度达 50℃时就不存在了，而当温度超过 60℃时，真菌几乎完全消失（王伟东等，2006）。

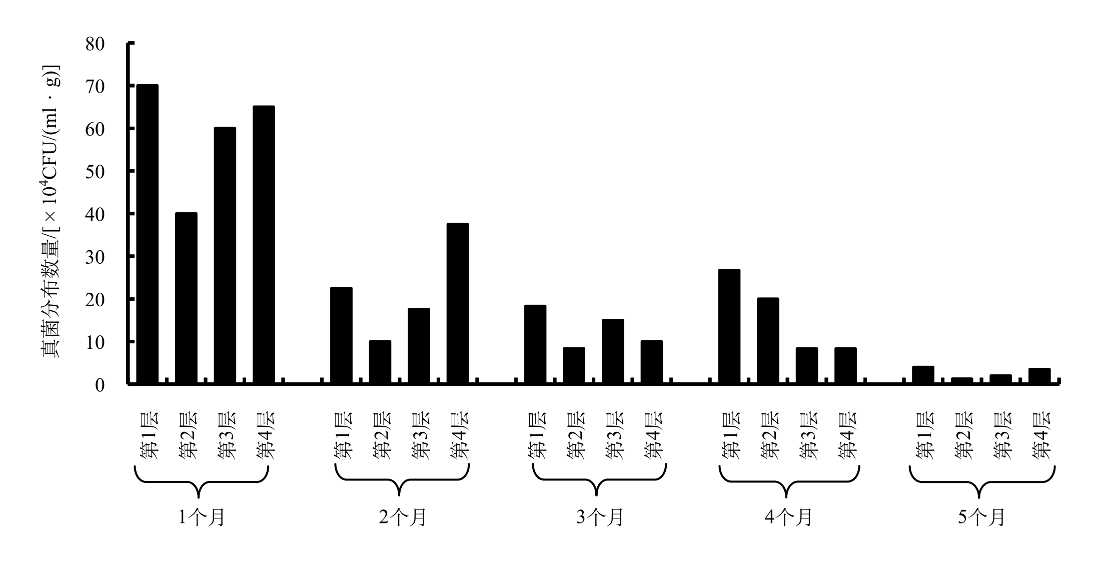


图 7-56 微生物发酵床养猪猪舍基质垫层真菌的分布动态

五、微生物发酵床放线菌数量变化

垫料使用过程中放线菌数量变化见图 7-57，放线菌数量的变化趋势与真菌相似，即在垫料使用初期，放线菌的数量较多，然后逐渐减少，其数量上低于细菌，略高于真菌。在开始使用的前两个月，垫层中的放线菌分布数量较多，分布数量为 2.2～4.18×10^6CFU/g。从第 3 个月开始，放线菌的数量显著减少，5 个月后其分布数量比第 1 个月减少了 52.9%～97.8%。

六、基质垫层细菌种类分子鉴定

实验结果见表 7-63，根据细菌分类学家的普遍认识，与 16S rDNA 序列同源性低于 93%～95%可能为属外成员，96%～98%则可能为属内新成员（Tiquia *et al*., 2002；Khalil *et al*., 2001）。一般研究认为，凡是 16S rDNA 序列的同源性大于 97%便可认为是同一种（湛方栋等，2005）。对 5 个月中从基质垫料中分离的 72 株细菌进行 16S rDNA 测序鉴定，其序列匹配度都为 97%～100%，基本认为属于同一个属细菌，这 72 株细菌分属于细菌域的 4 个门（Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes），22 个属（*Acinetobacter*、*Arthrobacter*，*Bacillus*、*Brachybacterium*、*Brachymonas*、*Bacillus*、

Burkholderiales、*Comamonas*、*Corynebacterium*、*Gordonia*、*Klebsiella*、*Microbacterium*、*Ochrobactrum*、*Paenibacillus*、*Paracoccus*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Rhodococcus*、*Serratia*、*Sphingobacterium*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*）。

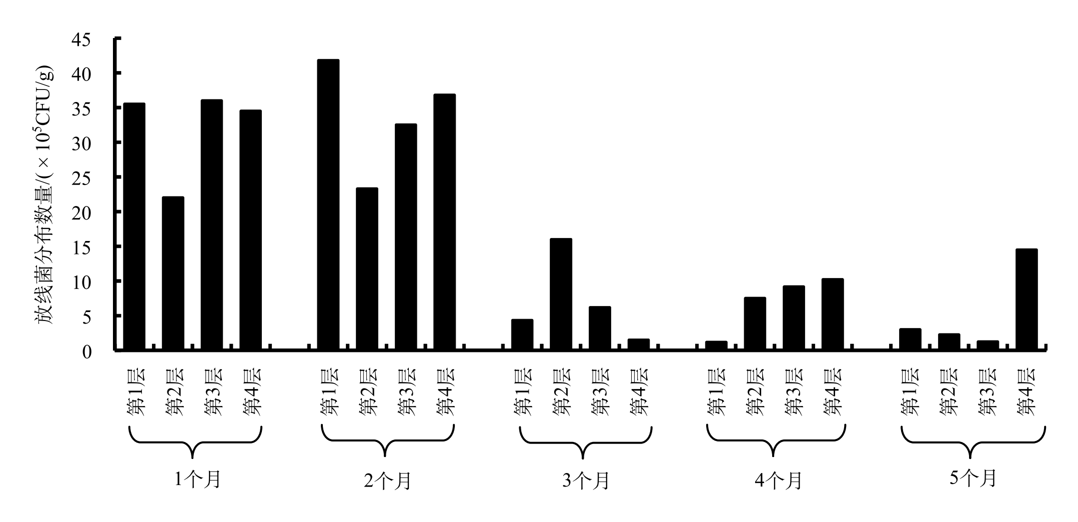


图 7-57　微生物发酵床养猪猪舍基质垫层放线菌的分布动态

表 7-63　基质垫层细菌鉴定

菌株编号	分离批次	属	种	
FJAT-8584	2	*Acinetobacter*	*Acinetobacter beijerinckii*	不动杆菌
FJAT-8440	1		*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌
FJAT-8436	1		*Acinetobacter junii*	琼氏不动杆菌
FJAT-8588	2		*Acinetobacter junii*	琼氏不动杆菌
FJAT-8590	2		*Acinetobacter junii*	琼氏不动杆菌
FJAT-8596	2		*Acinetobacter lwoffii*	鲁氏不动杆菌
FJAT-10521	4		*Acinetobacter seohaensis*	不动杆菌
FJAT-8846	3		*Acinetobacter* sp.	不动杆菌
FJAT-11369	5		*Acinetobacter* sp.	不动杆菌
FJAT-8506	1		*Acinetobacter towneri*	不动杆菌
FJAT-8847	3		*Acinetobacter towneri*	不动杆菌
FJAT-8845	3	*Arthrobacter*	*Arthrobacter nicotianae*	烟草节杆菌
FJAT-8848	3		*Arthrobacter nicotianae*	烟草节杆菌
FJAT-8591	2		*Arthrobacter protophormiae*	原玻璃蝇节杆菌
FJAT-8911	3		*Arthrobacter protophormiae*	原玻璃蝇节杆菌
FJAT-10505	4	*Bacillus*	*Bacillus amyloliquefaciens*	解淀粉芽胞杆菌

续表

菌株编号	分离批次	属	种	
FJAT-8597	2		*Bacillus anthracis*	炭疽芽胞杆菌
FJAT-8850	3		*Bacillus anthracis*	炭疽芽胞杆菌
FJAT-11363	5		*Bacillus anthracis*	炭疽芽胞杆菌
FJAT-11366	5		*Bacillus anthracis*	炭疽芽胞杆菌
FJAT-8344	1		*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌
FJAT-8844	3		*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌
FJAT-10516	4		*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌
FJAT-8854	3		*Bacillus flexus*	弯曲芽胞杆菌
FJAT-11373	5		*Bacillus flexus*	弯曲芽胞杆菌
FJAT-10503	4		*Bacillus licheniformis*	地衣芽胞杆菌
FJAT-8348	1		*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌
FJAT-8851	3		*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌
FJAT-10517	4		*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌
FJAT-10500	4		*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
FJAT-10501	4		*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
FJAT-10502	4		*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
FJAT-10508	4		*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
FJAT-10511	4		*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
FJAT-11361	5		*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌
FJAT-8346	1	*Brachybacterium*	*Brachybacterium zhongshanense*	短状杆菌
FJAT-8843	3	*Brachymonas*	*Brachymonas chironomi*	
FJAT-8349	1	*Brevibacillus*	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-8439	1		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-8594	2		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-8350	1		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-8853	3		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-10512	4		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-10515	4		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-10518	4		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-11372	5		*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌
FJAT-10504	4	*Burkholderiales*	*Burkholderiales bacterium*	伯克霍尔德氏菌
FJAT-8585	2	*Comamonas*	*Comamonas kersterii*	丛毛单胞菌属
FJAT-8589	2		*Comamonas testosteroni*	睾丸酮丛毛单胞菌
FJAT-8587	2	*Corynebacterium*	*Corynebacterium efficiens*	棒状杆菌属
FJAT-8441	1	*Gordonia*	*Gordonia cholesterolivorans*	戈登氏菌属
FJAT-8505	1	*Klebsiella*	*Klebsiella pneumoniae*	肺炎克雷伯斯氏菌

续表

菌株编号	分离批次	属	种	
FJAT-8345	1	*Microbacterium*	*Microbacterium arabinogalactanolyticum*	解阿拉伯半乳聚糖微杆菌
FJAT-11367	5		*Microbacterium barkeri*	巴氏微杆菌
FJAT-8351	1		*Microbacterium lacticum*	乳微杆菌
FJAT-8437	1		*Microbacterium lacticum*	乳微杆菌
FJAT-8593	2		*Microbacterium lacticum*	乳微杆菌
FJAT-8438	1		*Microbacterium* sp.	微杆菌
FJAT-10507	4	*Ochrobactrum*	*Ochrobactrum intermedium*	中间型苍白杆菌
FJAT-10519	4		*Ochrobactrum intermedium*	中间型苍白杆菌
FJAT-8586	2		*Ochrobactrum* sp.	苍白杆菌
FJAT-8849	3	*Paenibacillus*	*Paenibacillus polymyxa*	多粘类芽胞杆菌
FJAT-8852	3	*Paracoccus*	*Paracoccus aminovorans*	噬氨副球菌
FJAT-11370	5	*Pseudomonas*	*Pseudomonas alcaligenes*	产碱假单胞菌
FJAT-8352	1	*Ralstonia*	*Ralstonia pickettii*	皮氏雷尔氏菌
FJAT-8842	3	*Rhodococcus*	*Rhodococcus pyridinivorans*	红球菌
FJAT-8595	2	*Serratia*	*Serratia marcescens*	粘质沙雷氏菌
FJAT-8841	3	*Sphingobacterium*	*Sphingobacterium* sp.	鞘氨醇杆菌
FJAT-10514	4		*Sphingobacterium* sp.	鞘氨醇杆菌
FJAT-11371	5	*Staphylococcus*	*Staphylococcus epidermidis*	表皮葡萄球菌
FJAT-10506	4		*Staphylococcus gallinarum*	鸡葡萄球菌
FJAT-10510	4	*Stenotrophomonas*	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽寡养单胞菌

七、基质垫层细菌种群多样性

1）第 1 个月基质垫层细菌分布。不同使用时间的基质垫料中，可培养微生物种类和分布数量都有很大的差异，用 NA 培养基分离鉴定结果见表 7-64，第 1 个月，基质垫层中的细菌组成如表 7-64 所示，分别属于 3 个门（Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes），8 个属（*Brevibacillus*、*Microbacterium*、*Brachybacterium*、*Acinetobacter*、*Bacillus*、*Gordonia*、*Klebsiella*、*Ralstonia*），其中分布数量最大的是短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*），达 4.1634×10^7CFU/g，其次是乳微杆菌（*Microbacterium lacticum*）、短状杆菌（*Brachybacterium zhongshanense*）和琼氏不动杆菌（*Acinetobacter junii*），其分布量为 1.1967×10^7～1.785×10^7CFU/g。其中短短芽胞杆菌作为发酵床技术添加的环境益生菌，在基质垫层不同的层次中均有分布，且保持优势菌的地位，其他菌株在基质垫层不同层次中呈不完全分布。

表 7-64　基质垫层细菌分布（第 1 个月）

培养基	序号	细菌名称		细菌分布数量/（$\times 10^5$CFU/g）			
				第 1 层	第 2 层	第 3 层	第 4 层
NA	1	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	225	175	16.17	0.17
	2	*Microbacterium lacticum*	乳微杆菌	175	0	0	3.5
	3	*Brachybacterium zhongshanense*	短状杆菌	0	77.5	18.17	24
	4	*Acinetobacter junii*	琼氏不动杆菌	175	0	0	0
	5	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	0	18.17	0.5	0.67
	6	*Microbacterium* sp.	微杆菌属	127.5	0	0	0
	7	*Acinetobacter towneri*	不动杆菌属	75	0	0	0
	8	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	0	2	1.33	0.33
	9	*Microbacterium arabinogalactanolyticum*	解阿拉伯半乳聚糖微杆菌	0	1.5	0.33	0.67
	10	*Gordonia cholesterolivorans*	戈登氏菌属	50	0	0	0
	11	*Klebsiella pneumoniae*	肺炎克雷伯斯氏菌	0	0.33	0	0.5
	12	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	25	0	0	0
	13	*Ralstonia pickettii*	青枯雷尔氏菌	0	0	0	0.67
	14	*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌	0	0.17	0	0
	15	*Escherichia coli*	大肠杆菌	0	0	0	0
	16	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	0	0	0	0
EMB	17	*Escherichia coli*	大肠杆菌	225	175	16.17	0.17
SB	18	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	175	0	0	3.5

2）第 2 个月基质垫层细菌分布。从使用时间为 2 个月的基质垫料中分离的可培养细菌其种类和分布见表 7-65，分属于 3 个门（Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes），10 个属（*Arthrobacter*、*Acinetobacter*、*Brevibacillus*、*Comamonas*、*Corynebacterium*、*Microbacterium*、*Ochrobactrum*、*Bacillus*、*Comamonas*、*Serratia*）。其中分布数量最大的是原玻璃蝇节杆菌（*Arthrobacter protophormiae*），为 6.4333×10^7CFU/g。其次是醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）、短短芽胞杆菌（*B. brevis*）、丛毛单胞杆菌（*Comamonas kersterii*）、棒状杆菌（*Corynebacterium efficiens*），其分布数量为 1.1833×10^7～5.2333×10^7CFU/g。分布范围广，在垫料的不同层次中呈完全分布的有 4 类细菌：原玻璃蝇节杆菌（*Arthrobacter protophormiae*）、醋酸钙不动杆菌（*Acinetobacter calcoaceticus*）、短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）和乳微杆菌（*Microbacterium lacticum*）。

3）第 3 个月基质垫层细菌分布。第 3 个月垫料可培养细菌的鉴定结果和分布数量见表 7-66，其分离到的细菌分属于 4 个门（Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes），与前两个月相比，多了拟杆菌门（Bacteroidetes ）细菌，8 个属（*Sphingobacterium*、*Rhodococcusm*、*Brachymonas*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Paneibacillus*、*Acinetobacter*、*Paracoccus*）。其中分布数量最大的是鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium* sp.）和短单胞菌（*Brachymonas chironomi*），总分布量为 7.55×10^7CFU/g 和 7.15×10^7CFU/g。其中鞘氨醇杆菌、短单胞菌和短短芽胞杆菌在垫料层中呈完全分布。

表 7-65　基质垫层细菌分布（第 2 个月）

培养基	序号	细菌名称		细菌分布数量/（$\times10^5$CFU/g）			
				第 1 层	第 2 层	第 3 层	第 4 层
NA	1	*Arthrobacter protophormiae*	原玻璃蝇节杆菌	143.33	165	201.67	133.33
	2	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	466.67	38.33	13.33	5
	3	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	266.67	16.17	18.17	5
	4	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	0	0	3.33	0
	5	*Comamonas kersterii*	丛毛单胞菌属	116.67	0	1.67	3.33
	6	*Corynebacterium efficiens*	棒状杆菌属	50	60	8.33	0
	7	*Microbacterium lacticum*	乳微杆菌	50	3.33	11.67	3.33
	8	*Ochrobactrum* sp.	苍白杆菌	133.33	6.67	0	0
	9	*Comamonas testosteroni*	睾丸酮丛毛单胞菌	0	0	6.67	10
	10	*Acinetobacter lwoffii*	鲁氏不动杆菌	0	0	51.67	0
	11	*Bacillus anthracis*	炭疽芽胞杆菌	0	0	6.67	0
	12	*Serratia marcescens*	粘质沙雷氏菌	0	1.67	0	0
	13	*Escherichia coli*	大肠杆菌	0	0	0	0
	14	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	0	0	0	0
EMB	15	*Escherichia coli*	大肠杆菌	21.8	14.5	5	6.83
SB	16	*Salmonella*	沙门氏菌	68	31.5	26.8	10.3

表 7-66　基质垫层细菌分布（第 3 个月）

培养基	序号	细菌名称		细菌分布数量/（$\times10^5$CFU/g）			
				第 1 层	第 2 层	第 3 层	第 4 层
NA	1	*Sphingobacterium* sp.	鞘氨醇杆菌	690	20	15	30
	2	*Brachymonas chironomi*	短单胞菌	225	127.5	230	132.5
	3	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	127.5	20	60	2.5
	4	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	0	3.17	0	0
	5	*Rhodococcus pyridinivorans*	红球菌	15	0	10	7.5
	6	*Arthrobacter nicotianae*	烟草节杆菌	5	2.5	0	2.5
	7	*Acinetobacter towneri*	不动杆菌属	0	2.5	0	0
	8	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	0	2.5	0	0
	9	*Arthrobacter protophormiae*	原玻璃蝇节杆菌	2.5	0	0	0
	10	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	2.5	0	0	0
	11	*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌	0	0	2.5	0
	12	*Bacillus anthracis*	炭疽芽胞杆菌	0	0	2.5	0
	13	*Bacillus flexus*	弯曲芽胞杆菌	0	0	0	2.5
	14	*Paneibacillus polymyxa*	多粘类芽胞杆菌	0	2.5	0	0
	15	*Paracoccus aminovorans*	噬氨副球菌	0	0	2.5	0
	16	*Escherichia coli*	大肠杆菌	0	0	0	0
	17	*Salmonella*	沙门氏菌	0	0	0	0
EMB	18	*Escherichia coli*	大肠杆菌	4.5	1.5	0.1	0.5
SB	19	*Salmonella*	沙门氏菌	68	31.5	26.8	10.3

4）第 4 个月基质垫层细菌分布。第 4 个月，基质垫层分离可培养细菌的鉴定结果和分布数量见表 7-67，属于细菌域的 3 个门类（Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes）。比第 3 个月少了放线菌门（Actinobacteria）细菌，8 个属（*Microbacterium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*、*Sphingobacterium*、*Acinetobacter*、*Burkholderiales*）。其中以微杆菌（*Microbacterium* sp.）、短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）和鸡葡萄球菌（*Staphylococcus gallinarum*）的分布量最大，总分布量分别为 6.95×10^7CFU/g、2.25×10^7CFU/g、1.25×10^7CFU/g。其中枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）、短短芽胞杆菌和微杆菌在每个垫料层中均有分布。

表 7-67　基质垫层细菌分布（第 4 个月）

培养基	序号	细菌名称		细菌分布数量/（$\times10^5$CFU/g）			
				第 1 层	第 2 层	第 3 层	第 4 层
NA	1	*Microbacterium* sp.	微杆菌属	120	240	155	180
	2	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	70	120	25	10
	3	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	20	15	15	15
	4	*Staphylococcus gallinarum*	鸡葡萄球菌	55	0	70	0
	5	*Bacillus licheniformis*	地衣芽胞杆菌	5	0	15	10
	6	*Bacillus amyloliquefaciens*	解淀粉芽胞杆菌	10	5	0	0
	7	*Stenotrophomonas maltophilia*	嗜麦芽寡养单胞菌	0	40	0	0
	8	*Sphingobacterium* sp.	鞘氨醇杆菌属	0	25	0	0
	9	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	0	0	0	10
	10	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	0	0	10	0
	11	*Bacillus megatherium*	巨大芽胞杆菌	0	0	5	0
	12	*Burkholderiales bacterium*	伯克霍尔德氏菌属	5	0	0	0
	13	*Escherichia coli*	大肠杆菌	0	0	0	0
	14	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	0	0	0	0
EMB	15	*Escherichia coli*	大肠杆菌	2.5	1.5	0	0
SB	16	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	5.5	1.2	1.05	3

5）第 5 个月基质垫层细菌分布。第 5 个月，基质垫层分离可培养细菌的鉴定结果和分布数量见表 7-68，所分离出来的细菌属于细菌域的 3 个门类（Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria），与第 4 个月相比，少了拟杆菌门（Bacteroidetes）细菌，多了变形菌门（Proteobacteria），6 个属（*Microbacterium*、*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*）。其中分布数量最大的是巴氏微杆菌（*Microbacterium barkeri*），总分布量为 6.20×10^7CFU/g，主要分布在垫料表层；其次是短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brev*is）和枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*），总分布量为 9.0×10^6CFU/g 和 5.0×10^6CFU/g，在垫料不同层次中呈完全分布。

表 7-68　基质垫层细菌分布（第 5 个月）

培养基	序号	细菌名称		细菌分布数量/（$\times10^5$CFU/g）			
				第 1 层	第 2 层	第 3 层	第 4 层
NA	1	*Microbacterium barkeri*	巴氏微杆菌	600	20	0	0
	2	*Bacillus subtilis*	枯草芽胞杆菌	50	20	15	5
	3	*Brevibacillus brevis*	短短芽胞杆菌	10	20	15	5
	4	*Bacillus cereus*	蜡状芽胞杆菌	10	0	5	10
	5	*Staphylococcus epidermidis*	表皮葡萄球菌	0	0	0	61
	6	*Pseudomonas alcaligenes*	产碱假单胞菌	0	0	2.5	0
	7	*Acinetobacter calcoaceticus*	醋酸钙不动杆菌	0	0	37.5	0
	8	*Bacillus flexus*	弯曲芽胞杆菌	0	5	0	0
	9	*Escherichia coli*	大肠杆菌	0	0	0	0
	10	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	0	0	0	0
EMB	11	*Escherichia coli*	大肠杆菌	1.5	1	0	0
SB	12	*Salmonella* sp.	沙门氏菌	5	7	1.7	0.4

八、讨论

发酵床微生物群落在发酵床养猪技术中起到决定性的作用（杨群等，2009），基质垫层中的微生物数量是标志垫料生物学性质的重要标记，其群落动态与垫层有机物质成分和含量、微生物间的相互作用等多种因素密切相关（梁皓仪，2009；李庆康和吴雷，2000；李国学等，2003）。目前在微生物发酵床基质垫层中微生物种群消长动态的数据研究还未见报道。本研究对基质垫料使用过程中细菌、真菌、放线菌的时空动态分布进行监测，发现在垫料的发酵使用过程中，细菌是优势种群，分布量达到了 10^8 数量级。真菌和放线菌的数量相对于细菌低 3～4 个数量级。从使用时间上看，随着垫料使用时间的增加，细菌数量呈现先上升后下降的趋势，细菌总量在第 2 个月达最大值，放线菌在前 2 个月分布数量较大，第 2 个月略高于第一个月，从第 3 个月开始，数量显著减少，而真菌的数量则是随着垫料使用时间的增加而逐渐减少。从空间上看，细菌主要分布在垫料表层，里层的分布量明显减少，真菌和放线菌在不同层次中的分布情况比较复杂，一般情况下，表层和最里层的分布相对较多。

在微生物发酵床基质垫层这个微生态系统中，动物体内固有的微生物菌群、微生物饲料添加剂、垫料中添加的环境益生菌和垫料中生长的微生物菌群，组成了动物体（猪）内外的微生态系统。对基质垫层中分离的细菌经 16S rDNA 基因扩增和序列测定表明，72 株细菌分属于细菌域的 4 个门类（Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes），22 个属（*Acinetobacter*、*Arthrobacter*、*Brevibacillus.*、*Brachybacterium*、*Brachymonas*、*Bacillus*、*Burkholderiales*、*Comamonas*、*Corynebacterium*、*Gordonia*、*Klebsiella*、*Microbacterium*、*Ochrobactrum*、*Paenibacillus*、*Paracoccus*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Rhodococcus*、*Serratia*、*Sphingobacterium*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*），

在 NA 培养基中未分离到大肠杆菌（*Escherichia coli*）和沙门氏菌（*Salmonella*）。在垫料使用过程中，芽胞杆菌属细菌是最重要的优势菌，在垫料的不同使用时间、不同层次均有分离到，其中短短芽胞杆菌（*Brevibacillus brevis*）作为发酵床技术添加的环境益生菌，在发酵床基质垫料中占最主要的优势地位。从使用时间上看，短状杆菌（*Brachybacterium zhongshanense*）、琼氏不动杆菌（*Acinetobacter junii*）、解阿拉伯半乳聚糖微杆菌（*Microbacterium arabinogalactanolyticum*）、肺炎克雷伯斯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）、戈登氏菌属（*Gordonia cholesterolivorans*）仅在垫料使用初期（使用 1 个月）存在，而巴氏微杆菌（*Microbacterium barkeri*）、表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、产碱假单胞菌（*Pseudomonas alcaligenes*）则在垫料使用后期（使用 5 个月）才出现。

参 考 文 献

安千里, 杨学建, 董越梅, 冯丽洁, 匡柏健, 李久蒂. 2001. 用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根. 植物学报, 43(6): 558-564.

安然, 易图永, 肖启明, 邓子牛. 2010. *gyrB* 基因在细菌分类和检测中的应用. 江西农业学报, (4): 18-20.

敖维平, 杨正德. 2004. 饲料纤维素酶的研究进展与应用现状. 贵州农业科学, 32(4): 77-79.

白兰芳, 高慧, 刘明启, 戴贤君, 关荣发. 2011. 产果胶酶枯草芽孢杆菌的鉴定、发酵条件优化及产物酶学性质的研究. 中国畜牧杂志, 47(19): 63-68.

柏建玲, 莫树平, 郑婉玲, 贺鹰传. 2003. 地衣芽孢杆菌与其他微生物产酶能力的比较. 饲料研究, (7): 4-6.

包怡红, 李雪龙, 杨传平. 2008. 类芽孢杆菌木聚糖酶产生菌株的筛选及其产酶条件优化. 东北林业大学学报, (9): 70-73.

包怡红, 刘伟丰, 毛爱军, 董志扬. 2005. 耐碱性木聚糖酶高产菌株的筛选、产酶条件优化及其在麦草浆生物漂白中的应用. 农业生物技术学报, 13(2): 235-240.

鲍振国, 张文举. 2013**.** 枯草芽孢杆菌发酵产物有效磷变化及常规营养成分的评定. 饲料博览, (7): 1-5

毕捷, 张乃莉, 梁宇, 蔡禄, 马克平. 2012. 氮水添加对半干旱地区草原土壤微生物群落结构的交互影响. 广东农业科学, 39(19) :166-170.

布坎南 R E, 吉本斯 N E. 1984. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版). 北京: 科学出版社: 1729-1760.

蔡成岗, 郑晓冬, 以羽毛. 2009. 人发为枯草芽胞杆菌 KD-N2 液体发酵碳、氮源生产角蛋白酶模型的建立. 农业生物技术学报, (2): 328-333.

蔡恒, 陈忠军, 路福平, 杜连祥. 2004. 地衣芽孢杆菌耐高温 α-淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆及表达. 食品与发酵工业, 30(12): 15-18.

蔡恒, 陈忠军, 万红贵, 王涛, 杜连祥. 2008. 地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶信号肽的序列分析及其在大肠杆菌中的分泌特性. 华北农学报, 23(2): 106-109.

蔡健, 刘志, 王跃强, 徐荣险, 周顺桂. 2011. 蓝藻发酵生产微生物农药的影响因素研究. 生态环境学报, 20(5): 951-955.

蔡兴旺, 杜连祥, 路福平. 2011. N^+离子注入诱变选育耐酸性 α-淀粉酶高产菌株. 原子能科学技术, 45(4): 467-473.

蔡学清, 何红, 胡方平. 2003. 双抗标记法测定枯草芽胞杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态. 福建农林大学学报 (自然科学版) 32(1): 41-45.

蔡亚君, 袁志明, 胡晓敏, 蔡全信. 2011. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶基因的克隆及诱导表达. 湖北农业科学, 50(3): 599-602.

曹芳, 余秀梅, 郭娟利, 杨晓, 潘康成. 2012. 巨大芽孢杆菌 MBFF6 产絮凝剂培养条件的优化及絮凝剂的化学性质. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 38(6): 669-674.

曹国文. 2003. 杜仲叶饲料添加剂的开发与应用研究. 饲料广角, 23: 31-31.

曹均, 吴姬, 赵小蓉, 李贵桐, 孙明德, 曹庆昌, 林启美. 2010. 北京 9 个典型板栗园土壤碳代谢微生物多样性特征. 生态学报, 30(2): 0527-0532.

曹理想, 田新莉, 周世宁. 2003. 香蕉内生真菌、放线菌类群分析. 中山大学学报 (自然科学版), 42(2):

70-73.
曹鹏涛, 杨丽娜, 龚月生, 张建, 杨明明. 2012. 应激诱导木聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中表达. 西北农业学报, 21(3): 55-58.
曹要玲, 白晓婷, 刘辉, 李旺, 杨明明, 龚月生. 2006. 1 株产碱性木聚糖酶的芽胞杆菌的分离鉴定及其相关研究. 畜牧与兽医, 38(9): 11-14.
曹宜, 刘波, 朱育菁, 葛慈斌. 2003. 青枯病生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 菌株生物学特性的研究. 福建农业学报, 18(4): 239-242.
曹煜成, 李卓佳, 杨莺莺, 文国樑, 黄洪辉. 2010. 地衣芽孢杆菌 De 株对黄鳍鲷生长及其养殖池塘主要环境因子的影响. 南方水产, 6(3): 1-6.
柴家前, 孙明军, 杨倩. 2001. 短乳杆菌的分离鉴定及其对鸡肠粘膜 siga 分泌的影响. 中国兽医学报, 21(5): 485-488.
常明, 孙启宏, 周顺桂, 倪晋仁. 2010. 苏云金芽孢杆菌生物杀虫剂发酵生产的影响因素及其工艺选择. 生态环境学报, 19(6): 1471-1477.
常维山, 张春阳, 牛钟相, 朱立贤, 谢幼梅. 2003. 产蛋白酶枯草芽胞杆菌益生菌种的筛选与应用. 中国畜牧杂志, 39(3): 10-11.
车建美, 付萍, 刘波, 郑雪芳, 林抗美. 2010. 保鲜功能微生物 FJAT-0809-GLX 对龙眼保鲜特性的研究. 热带作物学报, 31(9): 1632-1640.
车建美, 蓝江林, 刘波. 2008. 转绿色荧光蛋白基因的青枯雷尔氏菌生物学特性. 中国农业科学, 41(11): 3626-3635.
车建美, 刘波, 蓝江林. 2010. 短短芽孢杆菌 JK-2 的 GFP 标记及其抑菌作用. 中国生物防治, 26(2): 230-234.
车建美, 刘波, 张彦, 胡桂萍, 黄勤楼, 陈忠细, 翁伯琦. 2010. 几种禾本科牧草内生细菌的分布特性. 草业学报, 19(003): 124-131.
车建美, 苏明星, 郑雪芳, 林抗美, 刘波. 2011. 保鲜功能微生物 FJAT-0809-GLX 对龙眼果实保鲜方法的优化. 中国农学通报, 27(23): 135-139.
车建美. 2011. 短短芽胞杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 对龙眼保鲜机理的研究. 福州:福建农林大学博士研究生学位论文.
陈弟, 殷晓敏, 张荣意. 2008. 内生枯草芽胞杆菌 B215 对香蕉炭疽菌抑制作用初探. 广西热带农业, 1: 1-2.
陈凤莲. 2012. 木聚糖酶合成菌株的诱变选育. 发酵科技通讯, 41(2): 21-24.
陈灏, 唐小树, 林洁, 张伯生, 任大明. 2002. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究. 微生物学报, 42(3): 478-483.
陈红歌, 顾溯海, 任随周, 马向东, 贾新成. 2004. 地衣芽孢杆菌 WB-11 菌株耐高温 α-淀粉酶的酶学特性. 南京农业大学学报, 27(1): 63-66.
陈焕春. 2008. 当前规模猪场病毒病趋向缓和细菌病呈上升态势. 养猪, (6): 55-55.
陈坚, 董云舟, 赵政, 堵国成. 2003. 促进剂对发酵生产碱性果胶酸裂解酶的影响. 无锡轻工大学学报 (食品与生物技术), 22(5): 95-97, 101.
陈凯, 薛东红, 夏尚远, 何亮, 王智文, 刘训理. 2006. 短短芽胞杆菌 *Brevibacillus brevis* XDH 菌株发酵培养基配方的研究. 山东农业大学学报 (自然科学版), 37(2): 190-195.
陈立军, 孙广宇, 张荣. 2004. 油菜内生真菌的分离鉴定. 石河子大学学报, 22(增刊): 66-68.
陈丽丽, 潘玉兰, 张建华. 2010. 纳豆芽孢杆菌谷氨酸脱氢酶基因的克隆、表达及酶活性测定. 上海交通

大学学报: 农业科学版, 28(1): 82-86.

陈莉, 缪卫国, 刘海洋, 努尔孜亚. 2008. 短短芽孢杆菌A57对棉花主要病原真菌的拮抗机理. 西北农业学报, 17(4): 149-155.

陈璐, 苏明星, 刘波, 黄素芳, 葛慈斌, 朱育菁. 2009. 动物饲用益生菌LPF-2对大肠杆菌抑制作用的培养条件优化. 中国农学通报, (16): 13-16.

陈梦. 2003. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨. 南京林业大学学报 (自然科学版), 27(5): 30-34.

陈敏, 赵立平. 2003. 焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性. 微生物学报, 43(3): 366-371.

陈俏彪, 王东明, 毛可红. 2011. 食用菌培养料细菌性污染的细菌种群特征. 江苏农业科学, 6: 417-418.

陈清华. 2011.我国饲料酶制剂生产技术研究现状. 饲料工业, (S1): 7-10.

陈庆河, 翁启勇, 胡方平. 2004. 无致病力青枯菌株对番茄青枯病的防治效果. 中国生物防治, 20(1): 42-44.

陈秋红, 孙梅, 匡群, 施大林, 刘淮, 胡凌虹, 张维娜, 夏冬, 朱清旭. 2009. 培养条件对凝结芽孢杆菌芽孢形成的影响. 生物技术, 19(1): 77-81.

陈仁华. 2004. 武夷山不同森林类型土壤微生物分布状况的研究. 福建林业科技, 31(4): 44-47

陈士成, 曲音波. 2000a. 短小芽孢杆菌 A-30 耐碱性木聚糖酶的纯化及性质. 中国生物化学与分子生物学报, 16(5): 698-701.

陈士成, 曲音波. 2000b. 产中性纤维素酶芽孢杆菌 Y106 产酶条件优化. 应用与环境生物学报, 6(5): 457-461.

陈士成, 曲音波, 姜英辉. 2000. 芽孢杆菌A-30碱性β-1, 4-聚糖酶发酵条件的优化. 工业微生物, 30(3): 16-19.

陈苏红, 张敏丽, 牟航, 管伟, 李鲁, 王升启. 2003. 实时荧光定量PCR法检测炭疽杆菌. 解放军医学杂志, 28(3): 268-270.

陈苏红, 张敏丽, 牟航, 管伟, 王升启. 2003. 一种快速定量检测炭疽杆菌方法的建立. 中华检验医学杂志, 26(3): 98-100.

陈相达, 戴慧慧, 刘燕, 李圆圆, 翁丛丛, 茹波, 曾爱兵. 2011. 一株高产淀粉酶枯草芽孢杆菌的筛选、鉴定及产酶条件的优化. 温州医学院学报, 41(1): 40-43, 47.

陈小飞, 熊仁次, 王兰, 陈恢彪, 张王斌, 但红侠, 黄妍妍. 2013. 南疆骏枣疮痂病空间分布型测定及抽样技术研究. 塔里木大学学报, 25(3): 9-13.

陈小静, 冯定胜, 赵明, 张小洁, 王一丁. 2005. 四种华重楼内生细菌的初步研究. 四川大学学报 (自然科学版), 42(4): 827-830.

陈晓敏, 胡方平, 吴燕榕. 2000. 福建省花生青枯病菌致病型及生物型的测定. 福建农林大学学报 (自然科学版), 29(4): 470-473.

陈雄, 袁金凤, 王志, 王永泽. 2009. 响应面法优化地衣芽胞杆菌A2发酵培养基. 中国饲料, 7:17-20.

陈旭东, 胥传来, 马秋刚, 计成. 2000. 金霉素、果寡糖和芽孢杆菌对断奶仔猪生产性能和血清学指标的影响. 中国畜牧杂志, 41(6): 25-27.

陈旋. 2006. 内生细菌和荧光假单胞杆菌的转基因菌株防治桉树青枯病研究. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文.

陈艳玲, 卢伟, 陈月华, 肖亮, 蔡峻, 韩苗苗. 2007. 苏云金芽孢杆菌 *chiA*, *chiB* 全基因的克隆、表达及其序列分析. 微生物学报, 47(5): 843-848.

陈艳希, 黄六莲, 吴姣平, 陈礼辉. 2013. 碱性木聚糖酶辅助漂白马尾松硫酸盐浆的研究. 福建林学院学报, (1): 93-96.

陈燕, 张燕红, 宋利丹, 邱婷玉, 郑毅. 2012. 枯草芽孢杆菌 FS106 杆菌肽发酵培养基优化. 安徽农学通报, 18(21): 80-82.

陈宜涛, 丁立孝, 程东庆, 丁志山, 林美爱, 潘佩蕾. 2006. 麦冬内生真菌镰刀菌的分离鉴定. 莱阳农学院学报, 23(1): 13-16.

陈艺晖, 林艺芬, 林河通, 孔祥佳, 赵云峰. 2010. 龙眼采后果皮褐变因素及防褐保鲜技术研究进展. 包装与食品机械, 28(3): 27-31.

陈营, 桂远明. 2001a. 几种离子及有机物对蜡样芽胞杆菌蛋白酶活力的影响. 中国微生态学杂志, 13(3): 146-148.

陈营, 桂远明. 2001b. 几种离子和有机化合物对枯草芽胞杆菌蛋白酶活力的影响. 大连水产学院学报, 16(2): 125-129.

陈营, 夏晓勤, 陆承平. 1999. 绿色荧光蛋白标记可移动载体质粒的构建及其在嗜水气单胞菌的表达. 农业生物技术学报, 7(4): 329-332.

陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 陈海如. 2012. 烟草可培养内生细菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 和系统发育分析. 中国烟草学报, 18(1): 92-100, 105.

陈志谊, 高太东, 严大富. 1997. 枯草芽胞杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验. 中国生物防治, 13(2): 75-78.

陈钟佃, 冯德庆, 黄温钟. 2010. 畜牧业发展与低碳经济. 中国农学通报, 24: 257-263.

陈宗懋. 1992. 茶叶中的农药残留最高允许限量(MRL). 农药科学与管理, 4.

程安春, 何明清, 陈孝跃. 1994. SA38 蜡样芽孢杆菌在体外对几种致病菌的生物拮抗试验. 中国兽医杂志, 20(2): 12-13.

程东升. 1993. 森林微生物生态学. 哈尔滨: 东北林业大学出版社: 81-84.

程亮, 肖爱萍, 游春平. 2005. 拮抗菌对香蕉枯萎病菌的抑制作用初步研究. 仲恺农业技术学院学报, 18(1): 9-13.

程琳琳, 王芳, 金莉莉, 王秋玉. 2009. 环保微生物菌剂常用 5 种芽胞杆菌的 PCR 鉴定. 微生物学杂志, 29(4): 36-40.

程仕伟, 崔海洋, 黄田红, 马玉岳, 刘进杰. 2013. 产纤维素酶枯草芽孢杆菌 B29 的鉴定与培养条件研究. 西华大学学报 (自然科学版), 32(3): 94-97, 104.

程仕伟, 王梦龙, 冯志彬, 程显好. 2012. 碱性蛋白酶产生菌的筛选鉴定及培养优化. 食品与生物技术学报, (6): 1314-1319.

程显好, 冯志彬, 屈慧鸽, 图力古尔. 2009. 短小芽孢杆菌固态发酵生产木聚糖酶的培养条件优化. 中国酿造, (5): 99-102.

程旭艳, 霍培书, 尚晓瑛, 李季. 2012, 堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果. 中国农业大学学报, 17(5): 105-111.

淳泽, 何明清. 1994. 芽孢杆菌对肠道致病菌体外生物拮抗作用的研究. 四川农业大学学报, S1: 627-634.

崔北米, 潘巧娜, 张陪陪. 2008. 大蒜内生细菌的分离及拮抗菌筛选与鉴定. 西北植物学报, 28(11): 2343-2348.

崔林, 孙振, 孙福在, 田宏先, 王利琴, 徐惠云. 2003. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定. 植物病理学报, 33(004): 353-358.

崔月明, 樊妙姬, 栾桂龙, 凌云, 韦莉莉, 蒋艳明. 2005. 枯草芽孢杆菌 XY1905 木聚糖酶酶学性质的初

步研究. 饲料工业, 26(6): 21-23.
崔月明, 樊妙姬, 韦莉莉, 栾桂龙, 童小国. 2008. 木聚糖酶产生菌 XY1432 液体发酵的响应面法优化. 化工技术与开发, 37(11): 12, 13-16.
代萌, 杜立新, 宋健, 曹伟平, 王金耀, 冯书亮. 2013. 五岳寨苏云金芽胞杆菌多样性分析及杀虫基因的鉴定. 中国农学通报, 29(6): 187-190.
戴传超, 余伯阳, 赵玉婷, 蒋继宏, 杨启银. 2006. 大戟科 4 种植物内生真菌分离与抑菌研究. 南京林业大学学报 (自然科学版), 30(1): 79-83.
戴德慧, 胡伟莲, 李巍. 2011. 培养条件对嗜热芽孢杆菌 HU1 合成几丁质降解酶及脱乙酰基酶的影响. 安徽农业科学, 39(5): 2543-2545, 2547.
戴莲韵, 王学聘, 杨光滢, 张万儒. 1993. 我国四个自然保护区森林土壤中苏云金芽胞杆菌的分布. 林业科学研究, 6(6): 621-626.
戴莲韵, 王学聘, 杨光滢, 张万儒. 1994. 我国森林土壤中苏云金芽胞杆菌生态分布的研究. 微生物学报, 34(6): 449-456.
戴美学, 武波, 柏学亮, 张成刚, 马庆生. 2003. 慢生型大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 聚羟丁酸合成酶基因 (*phbC*) 突变体的构建及其特性. 应用与环境生物学报, 9(3): 307-312.
戴求仲, 王向荣, 蒋桂韬, 张旭, 唐建忠. 2011. 日粮中添加芽孢杆菌制剂对黄羽肉鸡生长性能及养分利用率的影响. 家畜生态学报, 4: 18-22.
戴顺英, 高梅影, 李小刚, 李荣森. 1996. 我国南北方土壤中苏云金芽胞杆菌的分布及杀虫特性. 微生物学报, 36(4): 295-302.
邓曹仁, 潘远勇. 1998. 小麦纹枯病空间分布型及抽样技术研究. 浙江农业科学, (5): 236-238.
邓红梅, 毕方铖, 叶炬斌, 叶炼佳. 2010. 几丁质酶高产菌的筛选及其产酶条件的优化研究. 化学与生物工程, 27(5): 62-65.
邓露芳, 王加启, 姜艳美, 卜登攀, 魏宏阳, 周凌云, 王金枝. 2008. 犊牛饲用纳豆枯草芽孢杆菌液体培养条件的优化. 饲料工业, 29(6): 37-40.
邓明学, 陈贵峰, 唐明丽, 陈腾士. 2009. 正常管理果园柑桔木虱种群数量年消长规律调查及与次年黄龙病发生率的相关性分析. 中国农学通报, 18: 313-317.
邓小军, 周国英, 刘君昂, 李琳, 布婷婷. 2011. 湖南油茶林丛枝菌根真菌多样性及其群落结构特征. 中南林业科技大学学报, 31(10): 38-42.
邓雪萍, 杨博. 2010. 药用植物内生菌及其产生的活性成分研究现状. 安徽农学通报, 16(1): 72-74.
邓子煜, 徐先祥, 张小鸿, 章圣朋, 李俊, 李雯静. 2012. 夏枯草药理学研究进展. 安徽医学, 33(7): 937-939.
丁存宝, 刘海燕, 李明, 贾长虹, 张秀军. 2009. 短芽胞杆菌属菌株几丁质酶分离纯化及其抗真菌活性的初步测定. 中国抗生素杂志, 34(4): S7.
丁学知, 高必达. 2003. 高产超氧化物歧化酶芽孢杆菌 C328 菌株产酶培养基的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 26(4): 65-69.
东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社.
董春. 1999. 植物青枯病菌细菌素及其利用. 动植物检疫, (2): 32-34.
董红强, 刘峰, 慕卫, 朱天生. 2008. 黄瓜蔓枯病拮抗细菌的分离与筛选. 西北农业学报, 17(6): 205-209.
董斯明, 陈爱萍, 朱小顺, 鲁水龙, 刘洋. 2011. Plackett-Burnan 优化蜡样芽孢杆菌α-淀粉酶产酶条件. 中国酿造, (10): 115-118.
董秀梅, 张超范, 魏萍. 2004. 复合微生态制剂对肉仔鸡肠道菌群及抗氧化机能的影响. 中国家禽,

26(14): 11-13.
董越梅, 安千里, 李久蒂, 朱至清. 2000. 利用 GFP 和抗性双类型标记监测联合固氮菌在玉米根际的定殖. 应用与环境生物学报, 6(1): 61-65.
都立辉, 刘芳. 2006. 16s rDNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用. 乳业科学与技术, (5): 207-209.
杜鹃, 孙佰平, 赵思峰, 吴彩兰. 2013. 枯草芽孢杆菌S37沼液发酵培养基优化及其产物对棉苗立枯病的防治. 西北农业学报, 22(7): 35-42.
杜芝芝, 宋成芝, 郁步竹, 罗晓东. 2008. 滑桃树内生真菌 *Fusarium* sp. 2TnP1-2 次生代谢产物研究. 中国药物化学杂志, 6(18): 452-456.
段春燕, 龚月生, 范鑫, 杨明明, 张云雁, 周煌凯, 王新国. 2011. 枯草芽孢杆菌信号肽筛选载体的构建及木聚糖酶基因的表达. 西北农业学报, 20(1): 8-13.
段显德, 何兴隆, 徐松, 柳志诚, 杨信东. 2010. 古巴假霜霉菌在黄瓜中流行规律（Ⅰ）——显症、叶位与抗病力、孢子飞散分布. 东北林业大学学报, 38(4) :107-109.
樊后保. 2001. 福建土壤对酸沉降的相对敏感性评价与区划. 福建林学院学报, 21(3): 198-202.
樊竹青, 叶华. 2001. 滇池底泥中的芽胞杆菌. 思茅师范高等专科学校校报, 17(3): 1-4.
范国成, 刘波, 吴如健, 李韬, 蔡子坚, 柯冲. 2009. 中国柑橘黄龙病研究 30 年. 福建农业学报, 24(2): 183-190.
范继英, 何秋月. 2006. 枯草芽孢杆菌植酸酶的研究进展. 云南农业大学学报, 21(6): 715-720.
范晓静, 邱恩鑫, 胡方平. 2008. 内生解淀粉芽孢杆菌TB2内切β-1,4-葡聚糖酶基因的克隆和原核表达分析. 热带作物学报, 29(4): 443-449.
方中达. 1979. 植病研究方法. 北京: 农业出版社.
丰贵鹏, 杨丽云. 2009. 地衣芽孢杆菌发酵培养基的优化. 安徽农业科学, (15): 6862-6864.
冯涛, 阎婷婷, 阎国荣, 彭立新. 2010. 红花提取物清除自由基能力的初步研究. 天津农学院学报, 17(1): 6-9.
凤权, 汤斌, 陈中碧. 2007. 多粘芽孢杆菌发酵培养基优化及发酵特性研究. 食品与发酵工业, 33(7): 46-48.
付天玺, 许国焕, 吴月嫦, 龚全, 江永明. 2008. 凝结芽胞杆菌对奥尼罗非鱼消化酶活性、消化率及生长性能的影响. 淡水渔业, (3): 32-37.
付业勤, 蔡吉苗, 刘先宝, 黄贵修. 2007. 香蕉内生细菌分离、活性评价及数量分布. 热带作物学报, 4(28): 78-84.
付业勤, 张科立, 潘羡心, 蔡吉苗, 高宏华, 黄贵修. 2009. 内生拮抗细菌 BEB2 的分子鉴定及其对香蕉枯萎病菌的抑制作用. 热带作物学报, 30(1): 80-85.
傅正擎, 郑勤. 1999. 内生菌对棉花黄萎病病菌及毒素的抑制作用和对棉花的促生作用. 植物病理学报, 29(4): 374-375.
富相奎, 刘娣. 2005. 畜禽粪便处理与发展方略. 黑龙江农业科学, (1): 40-41, 57.
高必达. 2000. 真菌果胶酶的分子生物学研究进展. 生物工程进展, 20(6): 14.
高春生, 肖传斌, 王艳玲, 范光丽, 李建华, 刘忠虎. 2006. 日粮中添加植酸酶对草鱼生长的影响. 湖北农业科学, (3): 365-366.
高芬, 马利平, 乔雄梧. 2006. 蜡质芽胞杆菌BC98-I发酵液与抑菌提物对黄瓜枯萎病菌的抑菌特性研究. 中国农业生态学报, 14(1): 189-192.
高鹤永, 弓爱君, 曲冬梅, 邱丽娜. 2004. 正交设计法优化 Bt 发酵培养基. 现代农药, 3(5): 11-12, 39.
高红亮, 杨雪霞. 2002. 洗涤剂用碱性纤维素酶的研究进展. 微生物学通报, 29(6): 90-94.
高林, 陈涛, 高智谋. 2007. 蜡状芽孢杆菌深圳菌株 754-1 产磷酯酶 C 培养条件的优化研究. 安徽农业大

学学报, 34(4): 501-504.

高永生, 朱丽云, 朱贵州, 费瑶, 章宇星. 2011. 枯草芽孢杆菌产酶规律及酶学性质研究. 安徽农业科学, 39(19): 11964-11965.

高增贵, 陈捷, 刘限, 薛春生. 2006. 玉米品种遗传多态性与根际内生细菌种群的相互关系. 应用生态学报, 6(26): 1920-1926.

高增贵, 庄敬华, 陈捷, 刘限, 唐树戈. 2004. 玉米根系内生细菌种群及动态分析. 生态学报, 15(8): 1344-1348.

葛春辉, 徐万里, 邵华伟, 张云舒, 孙宁川, 王伟, 余琳. 2009. 一株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及其纤维素酶的部分特性. 生物技术, 19(1): 36-40.

葛慈斌, 刘波, 蓝江林, 黄素芳, 朱育菁. 2009. 生防菌 JK-2 对尖孢镰刀菌抑制特性的研究. 福建农业学报, 24(1): 29-34.

葛慈斌, 刘波, 蓝江林, 黄素芳, 朱育菁. 2009. 生防菌 JK-2 对尖孢镰刀菌抑制特性的研究. 福建农业学报, 24(1): 29-34.

葛慈斌, 刘波, 林营志. 2001. 生防菌蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 对青枯雷尔氏菌抑制作用效价的链霉素单位标定. 中国生物防治, 19: 42-45.

葛慧华, 李红春, 张光亚. 2011. 短小芽孢杆菌木聚糖酶的同源建模及分子动力学模拟. 华侨大学学报(自然科学版), 32(3): 296-299.

葛培锦, 赵建, 李雪芝. 2005. 麦草生物化机浆的木聚糖酶漂白. 纤维素科学与技术, 13(1): 6-10.

耿海波, 安丽平, 郭英, 陈力, 刘洁. 2009. 新疆十红滩砂岩型铀矿床中微生物多样性. 生态学杂志, 28(4): 710-714.

龚国淑, 唐志燕, 杨成伟, 张世熔, 邓香洁. 2009. 成都郊区土壤芽胞杆菌的生防潜力. 四川农业大学学报, 27(3): 333-337.

龚家玮, 朱春宝. 2004. 通过定向进化显著提高了葡萄糖脱氢酶的稳定性. 中国医药工业杂志, 35(5): 295.

龚一富, 高峰. 2008. 根癌农杆菌感染对甘薯外植体生理生化特性的影响. 中国农业科学, 41(6): 1649-1654.

龚玉霞, 蒋继宏, 陈凤美, 张小平. 2007. 蛇足石杉内生真菌的分离和抗植物病原真菌活性. 安徽师范大学学报 (自然科学版), 30(6): 689-692.

谷春涛. 2004.地衣芽孢杆菌 TS-01 培养条件的研究. 北京: 中国农业大学硕士学位论文.

顾真荣, 程洪斌, 魏春妹, 马承铸. 2006. 枯草芽孢杆菌 G3 抗真菌物质最低抑菌浓度和有效抑菌中浓度测定方法. 植物病理学报, 36(3): 279-280.

顾真荣, 马承铸, 韩长安. 2002. 枯草芽孢杆菌 G3 防治植病盆栽试验. 上海农业学报, 18(1): 77-80.

顾真荣, 魏春妹, 马承铸. 2005. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株抑制立枯丝核菌菌核形成的影响因子分析. 中国生物防治, 21(1): 33-36.

顾真荣, 吴畏, 高新华, 马承铸. 2004. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株的抗菌物质及其特性. 植物病理学报, (2): 166-172.

关雄, 陈锦权, 黄志鹏, 汤玉波, 高日霞. 1998. 苏云金芽孢杆菌培养基优化及间歇发酵. 生物工程学报, 14(1): 75-80.

管越强, 周环, 张磊, 张耀红. 2010. 枯草芽孢杆菌对中华鳖生长性能、消化酶活性和血液生化指标的影响. 动物营养学报, (1): 235-240.

郭爱莲. 1996. 一株产果胶酶菌株 Xg-01 的鉴定. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 24(2): 69-71.

郭成栓, 崔堂兵, 郭勇. 2007. 嗜碱芽孢杆菌产碱性纤维素酶研究概况. 氨基酸和生物资源, 29(1): 35-38.

郭成栓, 崔堂兵, 郭勇. 2007. 一株碱性纤维素酶高产菌株的分离、鉴定、系统发育分析及酶学性质的研究. 化学与生物工程, 24(10): 32-34, 48.

郭成栓, 崔堂兵, 郭勇. 2008. β-1, 4-葡聚糖内切酶基因的克隆及表达. 华南理工大学学报 (自然科学版), 36(12): 112-115, 145.

郭成栓, 欧阳蒲月, 崔堂兵, 郭勇. 2010. 短小芽孢杆菌β-1, 4-葡聚糖内切酶基因的克隆及在大肠杆菌中的分泌表达. 化学与生物工程, 27(12): 53-55, 68.

郭成栓, 欧阳蒲月, 崔堂兵, 郭勇. 2011. 一株碱性纤维素酶产生菌的分离、鉴定及酶谱分析. 生物技术, 21(1): 57-59.

郭凤莲, 陈存社. 2007. 产淀粉酶枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 测序鉴定. 中国酿造, (8): 26-28.

郭坚华, 潘登明. 1995. 抗青枯生防菌拮抗物性质的实步研究. 南京农业大学学报, 18(2): 59-62.

郭琳. 2008. 茶园土壤的酸化与防治. 茶叶科学技术, 2: 16-17.

郭荣君, 李世东, 张晶, 张璇, 穆光远, 王忠玉. 2010. 基于营养竞争原理的大豆根腐病生防芽孢杆菌的筛选及其特性研究. 植物病理学报, 40(3): 307-314.

郭万奎, 侯兆伟, 石梅, 伍晓林. 2007. 短短芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌采油机理及其在大庆特低渗透油藏的应用. 石油勘探与开发, 34(1): 73-78.

郭夏丽, 狄源宁, 王岩. 2012. 枯草芽孢杆菌产芽孢条件的优化. 中国土壤与肥料, (3): 99-103.

郭小华, 陆文清, 邓萍, 黄德仕. 2006. 益生枯草芽孢杆菌 MA139 增殖培养基的优化. 中国农业大学学报, 11(3): 41-46.

郭小华, 赵志丹. 2010. 饲用益生芽孢杆菌的应用及其作用机理的研究进展. 中国畜牧兽医, 37(2): 27-31.

郭岩, 杨之为. 1999.大丽轮枝菌在茄田土壤中的分布及抽样方法. 植物保护, 25(6): 1-4.

郭英, 刘栋, 赵蕾. 2009. 生防枯草芽孢杆菌胞外植酸酶对小麦耐盐性的影响. 应用与环境生物学报, 15(1): 39-43.

郭志凯, 王蓉, 蔡吉苗. 2007. 修臂形草内生真菌菌株 HND5 的分离、抗性评价及其初步鉴定. 热带作物学报, 28(2): 92-96.

国家药典委员会. 2010. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社: 263.

韩冬梅, 班慧芳, 余子全, 喻子牛, 孙明. 2008. 新型抑菌蛋白 APn5 抑制胡萝卜软腐欧文氏菌. 微生物学报, 48(9): 1192-1197.

韩双艳, 林小琼, 张溪, 林影. 2009. 枯草芽孢杆菌 B2(*Bacillus subtilis* B2) 木聚糖酶在毕赤酵母中的表达. 现代食品科技, (8): 872-876.

韩晓芳, 郑连爽. 2002. 产木聚糖酶嗜碱细菌的筛选及产酶条件研究. 环境污染治理技术与设备, 3(11): 25-27.

韩晓芳, 郑连爽. 2004. 嗜碱芽孢杆菌木聚糖酶在苇浆漂白中的应用初探. 农业环境科学学报, 23(6): 1144-1146.

韩学易, 陈惠, 吴琦, 梁如玉, 高凤菊, 胥兵. 2006. 产纤维素酶枯草芽胞杆菌 C-36 的产酶条件研究. 四川农业大学学报, 24(2): 178-183.

韩学易, 陈惠, 胥兵, 赖欣. 2008. 纤维素酶基因工程菌 pHBM-End 培养条件的研究. 中国饲料, (18): 14-17.

韩学易, 李治国, 陈惠. 2013. 饲用木聚糖酶基因的克隆及序列分析. 中国饲料, (4): 16-17, 21.

韩兆玉, 段智勇, 丁立人, 金志红, 劳晔. 2008. 酶制剂对奶牛产奶量和乳品质的影响. 粮食与饲料工业, (8): 39-40

郝变青, 马利平, 乔雄梧, 高芬. 2001. 拮抗菌对黄瓜枯萎病菌的室内生物活性. 应用与环境生物学报, 7(2): 155-157.

郝秋娟, 李永仙, 李崎. 2006. 淀粉液化芽孢杆菌产β淀葡聚糖酶培养基优化以及酶稳定剂的研究. 中国酿造, (4): 18-22.
郝向举, 李义, 王文娟, 郭明凯, 孙汉, 王玥. 2010. 蟹源地衣芽孢杆菌培养条件的优化. 中国饲料, (15): 28-31.
郝晓娟, 刘波, 葛慈斌, 周先治. 2009. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株抑菌活性物质产生条件的优化. 河北农业科学, 13(6): 46-49.
郝晓娟, 刘波, 谢关林, 葛慈斌, 林娟. 2007. 短短芽胞杆菌 JK-2 菌株抑菌物质特性的研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 33(5): 484-489.
郝晓娟, 刘波, 谢关林, 葛慈斌, 林抗美. 2007. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效. 中国生物防治, 23(3): 233-236.
郝晓娟, 刘波, 谢关林. 2005. 植物枯萎病生物防治研究进展. 中国农学通报, 21(7): 319-322, 337.
郝云婕, 韩素贞. 2008. *gyrB* 基因在细菌系统发育分析中的应用. 生物技术通报, 2: 39-41.
何宝花, 张利平, 张秀敏. 2008. 25 株植物内生放线菌的系统发育分析. 安徽农业科学, 36(12): 4882-4883, 4908.
何红, 蔡学清, 陈玉森. 2002. 辣椒内生枯草芽胞杆菌 BS-2 和 BS-1 防治香蕉炭疽病. 福建农林大学学报, 10(6): 735-738.
何红, 蔡学清, 洪永聪, 兰成忠, 关雄, 胡方平. 2002. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 中国生物防治, 18(4): 171-175.
何红, 邱思鑫, 胡方平, 关雄. 2004. 植物内生细菌生物学作用研究进展. 微生物学杂志, 24(003): 40-45.
何健源, 林建丽, 刘初钿, 陈鹭真, 李振基. 2004. 武夷山自然保护区蕨类植物物种多样性与区系的研究. 福建林业科技, 31(4): 40-43, 57.
何劲, 刘蕴哲, 康冀川. 2006. 植物内生菌及其在农业和医学上的用途. 贵州农业科学, 34(3): 113-115.
贺刚, 何力, 谢从新, 郝勃. 2008. 草鱼肠道一菌株产纤维素酶的分离纯化及性质研究. 水生态学杂志, 28(6): 107-110.
贺芸. 2006. 产胞外耐高温纤维素酶细菌的获得和酶的纯化及性质研究. 常州工学院学报, 19(1): 13-17.
洪永聪, 胡方平, 陈庆河, 黄晓南. 2001. 从稻谷上分离、筛选用于拮抗水稻白叶枯病的泛菌. 福建农业科技, 4: 1-2.
侯德联, 王红宁, 何明清, 陈增信, 谭廉宪, 何俭, 陈森权 . 1990. 调痢生调整牛、羊、马下痢的试验报告. 中国微生态学杂志, (2).
侯晓丽, 陈智. 2005. 分类及鉴别细菌的新靶标——*gyrB* 基因. 国外医学 •流行病学传染病学分册, 32(1): 38-41.
侯志翔, 张东晨. 2012. 煤泥水处理用微生物絮凝剂培养的优化试验研究. 煤炭加工与综合利用, (6): 20-22.
侯仲轲, 张立杰. 2000. 萜烯肟醚衍生物的合成及生物活性研究. 浙江化工, 31(Z1): 13-14.
侯仲轲, 毛春晖. 2000. 年英国布莱顿会议农药新品种与展望. 新农药, (4): 15-16.
胡春霞, 陆平, 李卫芬, 徐梓荣. 2009. 短芽孢杆菌耐碱性木聚糖酶(xylB) 的分子生物学研究. 食品与生物技术学报, 28(1): 86-90.
胡德朋, 唐家毅, 曹昱, 王永华, 杨博. 2008. 枯草芽孢杆菌的分离鉴定及酶系分布的研究. 水产科学, 27(2): 86-88.
胡浩, 殷幼平, 张利平, 赵云, 夏玉先, 王中康, 谭健. 2006. 柑桔黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测. 中国农业科学, 39(012): 2491-2497.
胡苗清, 姚明泽, 张耀华, 付月君, 梁爱华. 2011. 两株芽孢杆菌的鉴定及淀粉酶基因的克隆. 华北农学

报, 26(5): 103-106.
胡容平, 龚国淑, 杨皓, 卢代华, 叶慧丽. 2010. 四川中江县药用植物根际土壤真菌与放线菌数量研究. 安徽农业科学, 25: 13743-13744.
胡先望, 陈朋, 梁宁, 王雄, 严晓娟. 2012. 产异淀粉酶嗜热菌选育及产酶条件的研究. 湖南农业科学, (1): 8-11.
胡小加, 江木兰, 刘胜毅, 余常乐, 张银波, 廖星. 2009. 枯草芽胞杆菌在油菜根茎叶的定殖动态和生防作用研究. 中国油料作物学报, 31(1): 61-64.
胡学智, 凌晨. 1991. 高温 α-淀粉酶生产菌种选育的研究. 微生物学报, 31(4): 267-273.
胡宜刚, 叶震, 陈秀蓉. 2008. 高寒草地土壤优势细菌在草地物质循环中的作用初探. 草原与草坪, 227-29, 34.
胡勇, 王红宁, 吴琦, 邹立扣, 于新芬, 赵海霞. 2005. 枯草芽孢杆菌 WHNB 02 植酸酶的酶学性质研究. 微生物学杂志, 25(4): 16-19.
胡源媛, 张守文, 谢应根. 2006. 紫外诱变芽孢杆菌选育木聚糖酶高产菌株. 中国食品添加剂, (6): 113-117, 205.
户勋, 余萍, 方一泓, 李薇. 2007. 甘薯蔓割病菌对甘薯的诱导抗性和 PR 蛋白的性质测定. 福建师范大学学报 (自然科学版), 23(6): 77-81.
黄必旺, 谢宇飞, 沙莉, 黄志鹏. 2011. 苏云金芽孢杆菌 chi36 基因的克隆、表达和酶活性分析. 热带作物学报, 32(6): 1106-1110.
黄贵修, Yuka Takayama, Segenet Kelemu. 2002. 臂形草内生菌特异 DNA 片段的克隆及其分子鉴定. 热带作物学报, 23(4): 58-61.
黄国勇, 吴振强. 2006. 枯草芽孢杆菌产木聚糖酶发酵条件的研究. 河南工业大学学报 (自然科学版), 27(1): 32-35.
黄建新, 周欣. 2000. α-乙酰乳酸脱羧酶产生菌的筛选. 西北大学学报, 30(5): 408-410.
黄俊丽, 李常军, 王贵学. 2006. 枯草芽孢杆菌 B10 木聚糖酶基因的分子生物学. 重庆大学学报 (自然科学版), 29(6): 94-97, 101.
黄勤清, 黄志鹏, 关春鸿, 黄必旺. 2006. 苏云金芽孢杆菌 WB9 菌株的分离、生化特性及培养基优化. 福建农林大学学报 (自然科学版), 35(4): 346-351.
黄蓉, 肖炎农, 黄永兵, 成儒萍. 2007. 银杏内生真菌拮抗灰霉菌的初步研究. 江西农业学报, 19(2): 60-62.
黄世文, 王玲, 王全永, 唐绍清, 陈惠哲, 鄂志国, 王磊, 朱德峰. 2008. 纹枯病菌对不同水稻品种叶片中抗病性相关酶活性的影响. 中国水稻科学, 22(2): 219-222.
黄素芳, 肖荣凤, 杨述省, 杨述省,朱育菁, 刘波. 2010. 短短芽胞杆菌 JK-2 (*Brevibacillus brevis*) 胞外物质抗香蕉枯萎病菌的稳定性. 中国农学通报, 26(18): 284-288.
黄曦, 张黄荣韶, 黄荣灿, 庄军莲, 黄庶识. 2011. 一株抗荔枝病原菌的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究. 广西科学, 18(4) :396-401.
黄小光, 徐志宏, 邝哲师, 高云超, 叶明强, 潘木水, 陈薇. 2006. 香蕉枯萎病拮抗菌筛选试验. 广东农业科学, (11): 96-99.
黄小红, 陈清西, 王君, 沙莉, 黄志鹏, 关雄. 2005. 有机溶剂对苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 几丁质酶的影响. 应用与环境生物学报, 11(1): 71-73.
黄小红, 许雷, 陈清西, 王君, 沙莉, 关雄. 2005. 金属离子对苏云金芽孢杆菌几丁质酶活力的影响. 农业生物技术学报, 13(2): 264-265.

黄小龙, 孙焕良, 谢达平, 孟桂云. 2004. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究——Ⅳ. 酶法脱胶菌种的分离与鉴定. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 30(1): 14-16.
黄小龙, 孙焕良, 谢达平, 项伟, 李建军. 2004. 亚麻微生物脱胶菌种的筛选与鉴定. 生物学杂志, 21(1): 20-22.
黄小龙, 孙焕良, 谢达平, 赵丹, 孟桂元, 粟敏, 吴峰. 2004. 南方亚麻微生物脱胶技术及其理论研究 V. 环状芽孢杆菌 A6 的产酶条件. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 30(3): 227-228.
黄艳辉, 丰贵鹏, 杨晓娟. 2007. 胞苷发酵培养基的优化研究. 河南农业大学学报, 41(6): 651-654.
黄谚谚, 吴华珠, 许旭萍. 2012. 短小芽孢杆菌产碱性纤维素酶的发酵工艺优化. 贵州农业科学, 40(5): 172-175.
黄云红, 李长生, 龙中儿. 2003. 蜂房芽孢杆菌木聚糖酶的活性. 江西师范大学学报: 自然科学版, (4): 313-315.
惠明, 窦丽娜, 田青, 侯银臣. 2008. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展. 安徽农业科学, 36(27): 11623-11624.
惠友权, 黄建新, 孔锁贤. 2001. 离子注入选育 α-乙酰乳酸脱羧酶菌株. 西北大学学报, 31(3): 251-254.
霍军, 程会昌, 宋予震. 2004. 抗生素与芽孢杆菌制剂对猪生产性能影响的比较研究. 现代畜牧兽医, 11: 19-20.
季奎文, 吕学敏. 2005. 新型动物益生素凝结芽孢杆菌的开发与应用. 天津科技, 32(4): 50-51.
纪明山, 王毅婧. 2011. 地衣芽孢杆菌生防菌株 SDYT-79 发酵条件优化. 沈阳农业大学学报, 42(2): 164-169.
纪明山, 王英姿, 程根武. 2002. 西瓜枯萎病拮抗菌株筛选及田间防效试验. 中国生物防治, 18(2): 71-74.
贾士芳, 许怡, 刘志恒, 郭兴华, 阮继生. 1995. 空间条件对芽孢杆菌的超氧化物歧化酶和其它性质的影响. 航天医学与医学工程, 8(1): 12-14.
贾士儒, 赵树欣. 1995. 耐碱性芽孢杆菌碱性淀粉酶的研究: Ⅱ. 菌株的诱变与产酶条件. 工业微生物, 25(1): 13-16.
贾艳华. 2005. 红色荧光蛋白基因标记荧光假单胞菌的研究. 保定: 河北农业大学硕士学位论文.
贾月, 弓爱君, 邱丽娜, 王建森. 2005. 果胶酶分离纯化及分析方法的研究进展. 工业微生物, 35(1): 55-58.
江敏, 梁金钟. 2006. 益生菌腊样芽孢杆菌的筛选及培养基的优化. 中国奶牛, (2): 12-14.
江敏, 梁金钟. 2007. 动物肠道益生菌地衣芽孢杆菌的筛选及培养基的优化. 乳业科学与技术, (5): 247-249.
姜旭淦, 周丽萍, 徐顺高, 宋超, 邹昕. 2004. 葡萄糖脱氢酶连续监测法的研究. 江苏大学学报 (医学版), (416): 536-538.
姜怡, 杨颖, 陈华红, 李文均, 徐丽华, 刘志恒. 2005. 植物内生菌资源. 微生物学通报, 32(6): 146-147.
姜英辉, 曲音波. 1999. 碱性 β-聚糖酶产生菌选育及产酶条件优化. 应用与环境生物学报, 5(4): 404-410.
姜涌明, 史永昶. 1992. 枯草芽孢杆菌 86315 α-杆菌淀粉酶的研究. 江苏农学院学报, 13(2): 47-56.
蒋红彬, 蒋千里. 2000. 几丁质酶的研究概况. 山东科学, 13(3): 41-45.
蒋红亮, 张虹, 赵辅昆, 丁明. 2011. 分子伴侣 CsaA 过表达及 wprA 蛋白酶的缺失对枯草芽孢杆菌分泌表达外源蛋白的影响. 浙江理工大学学报, 28(2): 260-266.
蒋若天, 卢涛, 宋航, 张楠, 陈松. 2006. 一株 α-高温淀粉酶的地衣芽孢杆菌产酶培养基的优化. 现代食品科技, 22(4): 52-53, 56.
蒋若天, 宋航, 陈松, 蒲忠耀, 刘成君, 卢涛. 2007. 一株产 α-高温淀粉酶的地衣芽孢杆菌的分离和筛选. 工业微生物, 37(3): 37-41.

金杰, 李志西, 张锋, 魏宗萍, 解成骏. 2006. 桑椹醋提取物对二苯代苦味酰基自由基 (DPPH 提) 的清除作用. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 34(3): 135-137.

金志雄, 吴文琴, 张珍. 2004. 盾叶薯蓣淀粉对枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶活性的影响. 微生物学杂志, 24(4): 23-24, 45.

靳绍菊, 钟士传. 1997. 用荧光假单胞杆菌防治番茄青枯病. 农业新技术新方法, (1): 27-28.

柯崇榕, 黄薇, 秦勇, 田宝玉, 黄建忠. 2010. 侧孢短芽胞杆菌产生线虫侵染性蛋白酶的优化. 微生物学杂志, (6): 6-10.

柯崇榕, 田宝玉, 杨欣伟, 林伟铃, 黄薇, 黄建忠. 2008. 果胶酶高产菌株 EIM-4 的鉴定及其液体发酵条件优化. 生物技术, 18(5): 69-72.

孔凡利, 林文量, 严小龙, 廖红. 2005. 转枯草芽孢杆菌植酸酶基因烟草对不同介质中植酸磷的吸收利用. 应用生态学报, 16(12): 2389-2393.

孔凡真. 2005. 日本发酵床养猪技术简介. 肉品卫生, (2): 40, 42.

孔建, 王文夕, 赵白鸽. 1999. 枯草芽孢杆菌 B-903 菌株的研究: Ⅰ.对植物病原菌的抑制作用和防治试验. 中国生物防治, 15(4): 157-161.

孔建, 王文夕. 2000. 枯草芽孢杆菌B-903枯草芽孢菌株的研究: Ⅲ. 影响抗菌物质产生和积累的主要因素. 中国生物防治, 16(2): 65-68.

孔庆科, 丁爱云. 2001. 内生细菌作为生防因子的研究进展. 山东农业大学学报 (自然科学版), 32(2): 256-260.

孔显良, 江洪涛. 1993. 地衣芽杆菌胞外耐高温 α-淀粉酶的研究. 微生物学报, 33(4): 274-279.

库米拉·马吉提, 王伟, 张晓燕, 李静, 闫婷婷, 刘洋, 武运. 2012. 响应面法优化枯草芽孢杆菌发酵产低温淀粉酶的工艺条件. 新疆农业大学学报, 35(6): 478-483.

匡群, 陈秋红, 孙梅, 张维娜, 施大林, 胡凌, 高亮. 2012. 巨大芽胞杆菌的产酶特性及发酵条件的研究. 微生物学杂志, 32(6): 23-28.

来航线, 盛敏, 刘强. 2004. 两株蜡样芽孢杆菌的鉴定及液体培养基筛选. 西北农业学报, 1: 33-36.

蓝江林, 刘波, 陈璐, 肖荣凤, 史怀, 苏明星. 2010. 芭蕉属植物内生细菌磷脂脂肪酸(PLFA) 生物标记特性研究. 中国农业科学, 43(10): 2045-2055.

蓝江林, 刘波, 唐建阳, 郑雪芳, 叶耀辉. 2010. 基于微生物发酵床养猪模式的生态安全探讨. 中国农学通报, 26(19): 324-326.

蓝江林, 刘波, 朱育菁, 唐秋榕, 林抗美, 苏明星, 史怀. 2009. 茄子植物内生细菌群落结构与多样性. 生态环境学报, 18(4): 1433-1442.

蓝江林, 朱育菁, 苏明星, 葛慈斌, 刘芸, 刘波. 2008. 水葫芦内生细菌的分离与鉴定. 农业环境科学学报, 27(6): 2423-2429.

乐超银, 徐世谨. 2001. 转化 *cry3A* 基因对苏云金芽孢杆菌 YBT-803-1 生长特性的影响. 微生物学杂志, 21(2): 6-7, 25.

雷白时, 王笑颖, 郭晓军, 姜军坡, 朱宝成. 2012. 西瓜枯萎病拮抗细菌 HD-5 菌株的筛选及鉴定. 湖北农业科学, 51(11): 2236-2238.

雷寿平, 黄梅玲. 2005. 武夷山土壤资源的利用与保护. 山西师范大学学报 (自然科学版), 19(3): 104-106.

雷湘兰. 2006. 热带不同生态环境稀有放线菌分离、分类和活性初步测定. 华南热带农业大学硕士学位论文.

黎起秦, 陈永宁. 2000. 西瓜枯萎病生防细菌的筛选. 广西农业生物科学, 19(2): 81-84.

黎起秦, 卢继英, 林纬, 陈永宁, 卢亭君, 谢义灵, 韦文亮. 2004. 辣椒内生菌拮抗细菌的筛选. 广西农业生物科学, 23(4): 304-306.
黎起秦, 谢义灵, 林纬, 韦继光, 罗宽. 2006. 广西番茄内生细菌的多样性和数量动态. 生物多样性, 14(006): 534-540.
黎媛, 陆路, 方呈祥. 2003.SOD 对紫外辐射受损的苏云金芽孢杆菌作用的研究. 河南农业科学, (2): 20-23.
李宝聚, 彭霞薇, 刘秀丽. 2002. 瓜枝胞弱毒菌株致弱机理的研究. 农业生物技术学报, 10(3): 8-87.
李春华. 1999. 一株产耐热碱性脂肪酶芽孢杆菌的筛选及其所产酶性质的研究. 湖北大学学报, 21(3): 294-296.
李冬颖, 乔建军. 2001. α-淀粉酶基因在 D-核糖生产菌中的表达. 南开大学学报（自然科学版), 34(1): 1-4.
李刚, 孙俊良, 葛晓虹, 梁新红. 2010. 碳源对枯草芽孢杆菌产 α-淀粉酶的影响. 食品与机械, (5): 13-14, 18.
李刚. 2008. 猪胴体淋巴结中致病性大肠杆菌和沙门氏菌的分离与鉴定. 中国动物检疫, 25(10): 33-34.
李桂杰. 2001. 益生素-绿色养殖革命的使者. 中国畜牧业, (3): 41-41.
李桂杰, 张炬峰. 1999. 预混合饲料添加剂加工工艺探讨. 饲料工业, 20(11): 9-10.
李国建. 2004. 凝结芽孢杆菌替代抗生素对猪生产性能的影响. 河南农业科学, 10: 72-74.
李国学, 张祖锡, 白瑛. 1995. 高温堆肥和沤肥碳、氮转化和杀灭病原菌的比较研究. 北京农业大学学报, (3): 286-290.
李海峰, 叶永浩, 郭坚华. 2010. 枯草芽孢杆菌 7Ze3 环二肽的分离与鉴定. 江苏农业科学, (2): 107-109.
李合生, 孙群, 赵世杰. 2002. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社.
李辉, 张国芳, 石璐, 巩常军. 2010. 耐镉蜡状芽孢杆菌 SY 的筛选鉴定及其培养条件优化. 湖北农业科学, 49(6): 1353-1355.
李活孙, 陈济琛, 邱宏端, 林新坚. 2009. 应用响应面法优化嗜热脂肪土芽孢杆菌培养基. 生物技术, 19(6) :66-69.
李建洪, 万秋英, 王沫, 姜锡权, 喻子牛. 2000. 韩国土壤中苏云金芽胞杆菌菌株的分离和鉴定. 华南农业大学学报, 26(4): 293-295.
李捷, 李新辉, 贾晓平, 谭细畅, 王超, 李跃飞, 邵晓风. 2012. 连江鱼类群落多样性及其与环境因子的关系. 生态学报, (18): 5795-5805.
李金霞, 蔡恒, 路福平, 杜连祥. 2004. 地衣芽孢杆菌耐高温 α-淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆、表达及其产物的分泌. 食品与发酵工业, 30(3): 70-73.
李晶, 闫本良, 张淑梅, 王玉霞, 赵晓宇, 王佳龙. 2006. 枯草芽孢杆菌水剂对西瓜枯萎病的田间防效研究, 22: 65-67.
李晶, 杨谦, 张淑梅, 王玉霞, 赵晓宇. 2009. 枯草芽胞杆菌 B29 菌株防治黄瓜枯萎病的田间效果及安全性评价初报. 中国蔬菜, (2): 30-33.
李隽, 蒋如璋. 1999. 巨大芽孢杆菌 α-淀粉酶基因核苷酸序列分析. 生物工程学报, 15(1): 68-74.
李凯年(摘译). 2006. 添加产 α-淀粉酶大肠杆菌可提高肉鸡性能. 世界农业, (8): 61.
李力, 刘冬梅, 罗淑萍, 吴军, 余以刚. 2008. 高淀粉酶蛋白酶活力枯草芽孢杆菌菌株的筛选及鉴定. 渔业现代化, 35(2): 15-18.
李立恒, 兰时乐, 曹杏芝, 谢达平. 2005. 环状芽孢杆菌果胶酶及木聚糖酶活性测定条件优化. 湖南农业大学学报（自然科学版), 31(3): 304-306.
李立恒, 谢达平, 兰时乐. 2007. 环状芽孢杆菌 A6 产生的果胶酶和木聚糖酶分离纯化及酶学性质. 湖南

农业大学学报 (自然科学版), 33(6): 667-671.
李琦, 孙广宇. 2006. 沙棘内生菌的分离与初步鉴定. 中国农学通报, 22(10): 300-302.
李强, 刘军, 周东坡, 朱婧. 2006. 植物内生菌的开发与研究进展. 生物技术通报, 3: 33-37.
李庆康, 吴雷. 2000. 我国集约化畜禽养殖场粪便处理利用现状及展望. 农业环境科学学报, 19(4): 251-254.
李然, 邢介帅, 韩立英, 竺晓平, 赵蕾. 2008. 枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶突变株的筛选及其拮抗作用. 应用与环境生物学报, 14(2): 231-234.
李瑞芳, 徐怡, 田泱源, 张长付. 2010. 金属离子对枯草芽孢杆菌 BS501a 发酵液防治稻瘟病菌效果的影响. 河南工业大学学报 (自然科学版), 31(1): 80-83.
李盛, 顾真荣. 2002. 短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis* No. G1) 几丁质酶的提纯和分离鉴定. 生物化学与生物物理学报 (英文版), 34(6): 690-696.
李盛. 2002. 短芽胞杆菌 (*Bacillus brevis* No. G1) 几丁质酶的提纯及性质研究. 上海: 复旦大学硕士学位论文.
李术娜, 王全, 郭慧娟, 李红亚, 王树香. 2009. 棉花黄萎病拮抗细菌 2-70 (*B. subtilis*) 菌株定殖能力的研究. 中国农学通报, 25(15): 26-30.
李旺, 孙二刚, 刘永磊, 程传红. 2013. 添加纤维素酶产生菌对鸡饲料养分消化率的影响. 饲料博览, (5): 1-4.
李伟丽, 秦琦, 李良, 罗敏, 汪浩勇. 2008. 热休克蛋白对枯草芽孢杆菌抗逆性和乙醇产量的影响. 安徽农业科学, 36(21): 8963-8965.
李湘民, 许志刚, Mew T W. 2008. 稻株上拮抗细菌的定殖及其对土著细菌的影响. 生态学报, 28(8): 3868-3874.
李相安, 乔益磊. 1999. "普乐宝"在肉鸡日粮中的应用效果. 中国家禽, (8): 20-20.
李秀凉, 周东坡. 2008. 枯草芽孢杆菌 HD132 产生的α-淀粉酶性质的初步研究. 中国调味品, (10): 45-47, 55.
李亚玲, 赵玉洁, 谢凤行, 周可, 张峰峰. 2009. 枯草芽孢杆菌 H4 培养条件的优化. 天津农业科学, 15(4): 20-23.
李艳丽, 许少春, 柳永, 杨会玲, 许兴. 2011. 低聚木糖的制备及其对益生菌体外增殖的作用. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 37(3): 245-251.
李野, 张小平, 张克强, 孙文君, 李军幸. 2005. 蜡质芽孢杆菌 DLSL-2 发酵条件探讨及培养基优化. 微生物学通报, (2): 45-49.
李义民. 2009. 猪细菌病诊断识别与综合防治. 农技服务, (5): 119-123.
李永峰, 任南琪, 杨传平, 王秋玉, 刘桂丰. 2005. 16S rDNA 测序快速鉴定废水生物处理系统目标细菌. 哈尔滨工程大学学报, 26(6): 806-810.
李玉, 路福平, 刘逸寒, 戴永鑫, 杜连祥. 2006. 3-甾酮-1-脱氢酶基因的表达及甾体转化分析. 中国生物工程杂志, 26(11): 24-28.
李玉, 路福平, 王稳航, 杜连祥. 2006. 重组枯草芽孢杆菌的构建及对甾体的 C1, 2 位脱氢. 现代生物医学进展, 6(9): 15-17, 23.
李玉峰, 张笑宇, 胡俊, 姜晓环, 杨海明. 2009. 地衣芽孢杆菌代谢物对马铃薯晚疫病菌的抑制作用. 内蒙古农业大学学报, 1: 10-13.
李元召, 孙俊良, 李东霄, 张永帅. 2013. 一株产淀粉酶枯草芽孢杆菌 16S rDNA 的克隆及序列分析. 河南科技学院学报 (自然科学版), 41(3): 37-41.

李云明, 张颖, 顾云琴, 施海萍. 2014. 晚稻细菌性条斑病空间分布型及抽样技术研究. 农业技术与装备, (2) :4-5.

李占飞, 林陈强, 张慧, 李昱, 林新坚, 陈济琛. 2013. 枯草芽孢杆菌 CS16 抑菌活性与胞外产物成分分析. 热带作物学报, 34(6): 1155-1160.

李长友, 张杰, 宋福平, 李国勋, 黄大昉. 2004. 苏云金芽胞杆菌菌株 B-Pr-88 的生物学特性. 植物保护学报, 31(1): 21-25.

李振基, 陈鹭真, 林清贤, 林建丽, 刘德龙, 刘初细, 何建源. 2002. 武夷山自然保护区生物多样性研究 1. 小叶黄杨矮曲林物种多样性. 厦门大学学报 (自然科学版), 41(5): 574-578.

李志鹏.2009.解淀粉芽孢杆菌的选育及产中温 α-淀粉酶的研究. 无锡: 江南大学硕士学位论文.

李志真. 2009. 杨梅根瘤内生菌的生物学特性. 林业科学, 45(1): 81-87.

李智元, 弓爱君. 2010. 酶化苏云金芽孢杆菌固态发酵培养基研究. 西藏大学学报, (5): 108-110.

李卓佳, 袁丰华, 林黑着, 陆鑫, 杨其彬. 2011. 地衣芽孢杆菌对尖吻鲈生长和消化酶活性的影响. 台湾海峡, 30(1): 43-48.

李祖明, 范海延, 白志辉, 李洪勋, 荣瑞芬, 叶磊. 2008. 碱性果胶酶诱导黄瓜抗病机理的初步研究. 植物保护, 34(5): 52-57.

梁皓仪. 2009. "发酵床"养猪热下的冷思考. 北方牧业, (4): 4-5.

梁志怀, 魏宝阳, 魏林, 罗赫荣, 张其怡. 2008. 哈茨木霉在水稻体内的定殖及对水稻生理生化特性的影响. 湖南农业科学, (4): 51-53.

廖联安, 李正名, 方红云, 赵卫光, 陈明德, 范志金, 刘桂龙. 2002. 5-阿维菌素 B1a 酯的合成及生物活性. 高等学校化学学报, 23(9): 1709-1714.

廖祥六, 刘魁英, 赵宗芸. 2007. 柑桔微芽嫁接苗黄龙病的早期检测. 安徽农业科学, 35(9): 2578-2578.

林福呈, 李德葆. 2003. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用. 植物病理学报, 33(2): 174-177.

林福呈. 1990. 枯草芽胞杆菌产生的拮抗物质对西瓜枯萎孢子萌发的影响. 浙江农业大学学报, 16(增刊 2): 235-240.

林国宪, 黄勤清, 董德臻, 高日霞. 2003. 枯草芽孢杆菌 TH2 菌株抗菌物质产生的技术研究. 武夷科学, (1): 23-28.

林河通, 陈莲, 孔祥佳, 2007. 包装对龙眼果实贮藏期间果皮失水褐变和细胞超微结构的影响. 农业工程学报, 23(12): 237-241.

林河通, 席玙芳, 陈绍军. 2005. 龙眼果实采后失水果皮褐变与活性氧及酚类代谢的关系. 植物生理与分子生物学学报, 31(3): 287-297.

林剑, 郑舒文. 2002. 溶氧等参数对耐高温 α-淀粉酶发酵的影响. 食品科学, 23(3): 54-57.

林锦霞, 张燎原, 张光亚, 方柏山. 2007. 计算机模拟短小芽孢杆菌木聚糖酶与底物木聚糖的对接. 生物工程学报, 23(4): 715-718.

林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 庄铁诚. 2005. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性. 海洋学报, 27(3): 133-141.

林毅, 关雄. 2004. 苏云金杆菌几丁质酶新基因的筛选和全长基因的扩增. 生物技术, 14(3): 1-2.

林营志, 刘波, 张秋芳,傅秀荣. 2009. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记分析程序 PLFAEco. 中国农学通报, 25(14): 286-290.

林玉满, 余萍, 林少芳, 胡起靖, 陈祖亮. 2008. 7 株处理印染废水细菌的分离及鉴定. 福建师范大学学报 (自然科学版), 24(2): 105-108.

凌云, 徐亚同. 2006. 禽畜粪便高效降解菌对堆肥主要理化指标的影响. 河北农业大学学报, 29(1): 24-26, 37.
刘宝军, 徐亮, 胥丽娜, 董仲国, 刘振宇. 2008. 枯草芽孢杆菌 BSPE2501 对草坪炭疽病菌的抑制作用. 中国草地学报, 30(2): 79-84.
刘炳钻, 魏远竹. 2009. 香蕉枯萎病在中国的风险分析及适生区预测. 亚热带农业研究, 5(3): 167-172.
刘波, Sengonca C, 林营志. 2000. 苏云金芽胞杆菌发酵的微机控制技术. 中国生物防治, 16: 22-27.
刘波, Sengonca C, 彭小彤. 2000. 温度对小菜蛾生长发育的影响. 中国生物防治, 16: 35-38.
刘波, Sengonca C, 朱育菁. 2000a. 苏云金芽胞杆菌 LSZ9408 菌株的研究. 中国生物防治, 16: 1-5.
刘波, Sengonca C, 朱育菁. 2000b. 苏云金芽胞杆菌 LSZ9408 菌株培养特性的聚类分析. 中国生物防治, 16: 14-17.
刘波, 胡桂萍, 郑雪芳, 张建福, 谢华安. 2010. 利用磷脂脂肪酸(PLFAs) 生物标记法分析水稻根际土壤微生物多样性. 中国水稻科学, 24(3): 278-288.
刘波, 蓝江林, 林营志, 官雪芳. 2009. 土壤甲胺磷抗性细菌种群特征脂肪酸生物标记的分析. 生态毒理学报, 4(5): 734-744.
刘波, 蓝江林, 唐建阳, 史怀. 2015. 微生物发酵床菜猪大栏养殖猪舍结构设计. 福建农业学报, (5): 1521-1525.
刘波, 冒乃和. 2003. 德国农药审批制度与农药危害的风险防范. 世界农药, 25(2): 9-23.
刘波, 苑宝玲, Sengongca C. 2000. 高效生物杀虫剂藕合技术的研究. 中国生物防治, 16(增刊): 28-34.
刘波, 郑雪芳, 朱昌雄, 蓝江林. 2008. 脂肪酸生物标记法研究零排放猪舍基质垫层微生物群落多样性. 生态学报, 28(11): 5488-5498.
刘波, 朱昌雄. 2009. 微生物发酵床零污染养猪技术研究与应用. 北京: 中国农业科学技术出版社: 5.
刘波, 朱育菁, Sengonca C, 冒乃和, 林抗美, 阮传清. 2004. 害虫抗药性治理策略——多位点杀虫毒素的研究. 农药, 43(11): 492-496.
刘波, 朱育菁, 林抗美. 2000. 生物杀菌剂 ANTI-8098 防治番茄青枯病的作用机理. 中国生物防治, 16: 12-16.
刘波, 朱育菁, 肖荣凤, 林抗美, 冒乃和, 李芳, 苏明星, 史怀. 2004. 西瓜枯萎病病株空间分布格局及其抽样技术. 生态学报, 24(9): 2043-2049.
刘春喜, 贾昌泽, 陈斌, 何华. 2008. 猪细菌病诊断识别与综合防治（Ⅰ). 农技服务, (10): 94-98.
刘多涛, 杨谦, 王艳君, 张向东. 2010. 耐酒精半纤维素降解菌的筛选、鉴定及产酶分析. 太阳能学报, 31(1): 107-112.
刘芳, 梁运祥. 2005. 绿色荧光蛋白基因对枯草芽胞杆菌的标记. 湖南农业大学学报（自然科学版), 31(5): 543-545.
刘芳, 潘晓亮. 2006. 外源酶提高反刍动物饲料利用率的研究进展. 饲料工业, 27(23): 46-48.
刘芳, 潘晓亮. 2007. 用外源纤维素酶提高反刍动物对饲料的利用. 饲料研究, (1): 49-51.
刘刚, 邢苗, 余少文. 2005. 耐高温 α-淀粉酶在溶源性枯草杆菌表达系统中的高效表达. 应用与环境生物学报, 11(3): 368-372.
刘刚, 张燕, 邢苗. 2006. 双启动子对重组溶源性枯草杆菌中外源蛋白表达的增强作用. 生物工程学报, 22(2): 191-197.
刘国红, 林营志, 林乃铨, 刘波. 2011. 芽胞杆菌分类研究进展. 福建农业学报, 26(5): 112-113.
刘国红, 林营志, 刘波, 林乃铨. 2012. 芽胞杆菌种类脂肪酸鉴定与分子鉴定方法的比较. 福建农业学报, 27(2): 173-180.
刘国红, 刘波, 林乃铨, 林营志. 2008. 芽胞杆菌的系统进化及其属分类学特征. 福建农业学报, 23(4):

436-449.
刘国奇, 蒋如璋. 1999. 韭菜根际荧光假单胞菌株的分离和初步研究. 微生物学通报, 26(3): 189-192.
刘海进, 钱坤, 李吕木, 许发芝, 丁小玲, 景志远. 2011. 地衣芽孢杆菌 D-1 产碱性蛋白酶培养条件的优化. 激光生物学报, 20(3): 409-412, 387.
刘加合. 2012. 产纤维素酶益生菌——枯草芽孢杆菌的优化培养. 中国饲料添加剂, (3): 28-31.
刘建国, 裴炎. 2001. 蜡状芽孢杆菌 S1 发酵条件的研究. 工业微生物, 31 (1) : 4-7.
刘建军, 姜鲁燕. 1996. 碱性淀粉酶的研究. 山东食品发酵, (1): 2-6.
刘杰雄, 陈号, 陆雯, 朱丽云. 2010. 淀粉酶高产菌株的筛选及其酶活的测定. 食品工程, (1): 45-47.
刘洁丽, 王靖, 李明. 2010. 一株纤维素降解细菌的筛选、鉴定及特性研究. 化学与生物工程, (4): 54-56.
刘婧, 马汇泉, 董瑾, 杨晓. 2008. 蜡样芽孢杆菌 B-02 菌株培养基及培养条件的优化. 山东农业科学, (7): 54-57.
刘静, 王军, 姚建铭, 潘仁瑞, 于增亮. 2004. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 44(4): 511-514.
刘坤, 郭威, 胡雪芹, 张洪斌. 2011. 响应曲面法优化苏云金芽孢杆菌 B28 培养基. 安徽农业科学, 39(16): 9690-9692, 9694.
刘利华, 姚锦爱, 王茂珠, 陈玉妹, 种藏文. 2006. 柑桔黄龙病研究的回顾与展望. 福建农业学报, 21(4): 317-320.
刘连成, 沈标, 陆健, 梅琴, 徐莲. 2008. 地衣芽孢杆菌碱性果胶酶基因 *PelA* 的克隆与原核表达. 工业微生物, 38(1): 24-29.
刘琳, 刘洋, 宋未. 2009. PCR-DGGE 技术及其在植物微生态研究中的应用. 生物技术通报, (3): 54-56.
刘玲玲, 陈钧. 2009. 统计学方法优化麦麸发酵产木聚糖酶条件的研究. 中国粮油学报, (5): 107-109.
刘梅英, 彭健, 刘敏跃, 高雁. 2006. 从后处理工艺提高植酸酶热稳定性的研究进展. 饲料工业, 28(11): 1-3.
刘宁, 郭庆港, 安海, 李社增, 鹿秀云, 马平. 2009. 番茄灰霉病生防细菌 BAB-1 的鉴定及发酵条件的优化. 中国农业科技导报, (2): 56-62.
刘芹防, 崔尚金. 2009. 如何防治猪猪沙门氏菌病: 猪沙门氏菌病病原学、流行病学、诊断及防治进展. 猪业科学, 26(12): 24-28.
刘士清, 张无敌. 提高发酵液浓度生产中性蛋白酶研究. 云南大学学报 (自然科学版), 20(2): 112-115.
刘涛, 张冬冬, 姜军坡, 朱宝成, 王世英. 2013. 枯草芽孢杆菌 J-4 制剂对肉鸡肠道酶活力及消化性能的影响. 河南农业科学, 42(10): 133-136.
刘涛刁, 祁永青, 高晓杰. 2008. 根际微生物及对植物生长效应地初步研究. 青海草业, 17(4): 41-44.
刘伟丰, 毛爱军, 祝令香, 乔宇, 于巍, 董志扬. 2004. 短小芽孢杆菌 β-1, 4-木聚糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达. 农业生物技术学报, 12(4): 455-459.
刘伟丰, 毛爱军, 祝令香, 赵云, 董志扬. 2004. 耐碱性木聚糖酶基因在短小芽孢杆菌中高效分泌表达的研究. 微生物学报, 44(4): 487-490.
刘卫林, 陈长法. 2010. 发酵床养猪技术. 农技服务, 27(6): 769-770.
刘文霞, 郑桂玲, 梁革梅, 李长友, 李国勋. 2008. AcMNPV *chiA* 基因表达产物对棉铃虫围食膜的破坏及对 Bt 和 NPV 的增效作用. 农业生物技术学报, 16(6): 1042-1047.
刘五星, 徐旭士. 2002. 胶质芽孢杆菌发酵条件研究. 南昌大学学报 (理科版), 26(3): 299-302.
刘曦, 路福平, 黎明, 孙静, 王立国. 2008. 碱性果胶酶高产菌株产酶条件的优化. 生物技术, 18(6): 71-74.
刘相梅, 祁蒙. 2001. 短小芽孢杆菌 A-30 短小芽耐碱性木聚糖酶基因的分子生物学研究. 应用与环境生

物学报, 7(1): 61-65.
刘晓庚, 陈梅梅. 2004. 中国仙草的开发利用研究. 食品研究与开发, 25(5): 109-112.
刘晓玲, 王金晶, 李永仙, 李琦. 2013. 产 β-1, 3-1, 4-葡聚糖酶特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* CGX5-1 发酵培养基的优化. 食品与生物技术学报, 32(6): 645-650.
刘雄恩, 陈聪, 骆兰, 李潇, 关雄. 2008. 基于遗传算法的苏云金芽孢杆菌培养基配方优化. 应用与环境生物学报, 14(5): 705-709.
刘秀花, 梁峰, 刘茵, 瞿兴礼. 2006. 河南省土壤中芽胞杆菌属资源调查. 河南农业科学, (8): 67-71.
刘训理, 王超, 吴凡, 薛东红, 陈凯. 2006. 烟草根际微生物研究. 26(2): 552-557.
刘阳, 谭明, 潘宝平, 宋诶. 2012. 一株地衣芽孢杆菌的性质研究及发酵培养基优化. 安徽农业科学, 40(3): 1348-1351.
刘洋, 陈爱萍, 朱小顺, 鲁水龙, 刘玉东, 王龙, 刘莉. 2010. 一株蜡状芽孢杆菌α-淀粉酶产生菌株的分离鉴定及酶学性质研究. 中国酿造, (8): 68-71.
刘逸寒, 路福平, 王建玲, 胡博. 2011. 中温 α-淀粉酶基因的克隆及在枯草芽孢杆菌中的高效表达. 天津科技大学学报, 26(4): 1-5.
刘影, 马海霞, 杨信东, 李启云. 2008. 白菜黑斑病空间分布型研究及杀菌剂筛选. 北方园艺, (10): 171-174.
刘永生, 冯家勋, 段承杰, 莫新春, 柏学亮, 张成刚, 唐纪良, 马庆生. 2003. 能降解天然纤维素的地衣芽孢杆菌 GXN151 的分离鉴定及其一个纤维素酶基因(*cel5A*) 的克隆和测序分析. 广西农业生物科学, 22(2): 132-138.
刘永生, 冯家勋, 段承杰, 赵广存, 柏学亮, 张成刚, 唐纪良, 马庆生. 2003. 地衣芽孢杆菌 GXN151 的纤维素酶基因 cel12A 的序列分析及其在大肠杆菌中的表达. 广西农业生物科学, 22(3): 194-200.
刘永生, 张杰, 马庆生. 2003. 地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的克隆与表达. 沈阳农业大学学报, 34(4): 284-287.
刘咏梅, 王焕章, 雷剑芬, 陆可. 2001. 一株可积累鸟苷菌株的纯培养条件研究. 氨基酸和生物资源, 23(3): 24-27.
刘邮洲, 陈志谊, 梁雪杰, 朱剑花. 2012. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定. 中国生物防治学报, 28(1): 101-108.
刘玉新, 牛梅红, 汤德芳. 2004. 木聚糖酶用于纸浆漂白. 纸和造纸, 11(6): 76-78.
刘悦, 宋少江, 徐绥绪. 2003. 夏枯草的化学成分及生物活性研究进展. 沈阳药科大学学报, 20(1): 55-59.
刘云霞, 张青文, 周明牂. 1999. 水稻体内细菌的动态研究. 应用生态学报, 10(6): 735-738.
刘云霞. 1994. 植物内生细菌的研究与应用. 植物保护, 20(5): 30 -32.
刘蕴哲, 何劲, 张杰, 康冀川. 2005. 植物内生真菌及其活性代谢产物研究进展. 菌物研究, 3(4): 30-36.
刘战民, 陆兆新, 吕凤霞, 别小妹, 赵海珍. 2005. 枯草芽孢杆菌产原果胶酶发酵条件研究. 食品科学, 26(10): 130-134.
刘志辉, 蔡杏姗, 竺澎波, 关平, 许婉华, 吴龙章. 2005. 应用气相色谱技术分析全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌. 中华结核和呼吸杂志, 28(6): 403-406.
刘忠梅, 王霞, 赵金焕, 王琦, 梅汝鸿. 2005. 有益内生细菌 B946 在小麦体内的定殖规律. 中国生物防治, 21(2): 113-116.
龙良鲲, 肖崇刚. 2003. 内生细菌 01-144 在番茄根茎内定殖的初步研究. 微生物学通报, 30(5): 53-56.
卢焦, 赵秋敏, 陈艳玲, 韩苗苗, 蔡峻, 陈月华. 2007. 几丁质酶在苏云金芽孢杆菌中的分布及抑小麦赤霉菌菌株的筛选. 南开大学学报 (自然科学版), 40(3): 97-101.

卢立华, 齐秀玲, 王俊江. 2009. 微生态发酵床养猪的技术简介. 养殖技术顾问, (11): 13.

卢娜, 周顺桂, 常明, 倪晋仁. 2007. 玉米浸泡液制备苏云金杆菌生物杀虫剂的影响因素研究. 环境工程学报, 1(9): 126-130.

卢萍, Dnnis C, 赵萌莉, Dale R G, 吕桂芬, 韩国栋. 2009. 小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC.) 内生真菌的培养与鉴定. 生态学报, 1(29): 53-58.

卢舒娴. 2011.养猪发酵床垫料微生物群落动态及其对猪细菌病原生防作用的研究. 福州: 福建农林大学硕士学位论文.

卢涛, 陈金瑞. 2002. 高温 α-淀粉酶产生菌株的选育. 四川大学学报 (自然科学版), 39(6): 1131-1133.

卢伟, 蔡峻, 陈月华. 2007. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶的研究进展. 微生物学通报, 34(1): 143-147.

卢耀俊, 周世水, 朱明军. 2008. 一株水产用益生枯草芽孢杆菌液体发酵初步研究. 渔业现代化, 35(1): 20-22.

卢云, 罗明. 2004. 哈密瓜内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 石河子大学学报, 22(104): 409.

鹿秀云, 李社增, 栗秋生, 孔令晓, 刘杰, 马平, 高胜国. 2006. 玉米叶斑病拮抗细菌的筛选及其发酵培养基优化. 中国生物防治, 22(S1): 47-53.

路程, 周长海, 于红梅, 刘婷, 乌日汗. 2009. 凝结芽孢杆菌 T50 产芽孢条件优化的研究. 中国酿造, (7): 93-95.

路福平, 戚薇. 1997. 凝结芽孢杆菌 TQ33 所产抗菌物质及特性. 中国乳品工业, (4): 15-17.

路福平, 戚薇. 1998. 凝结芽孢杆菌 TQ33 检测方法的建立. 中国乳品工业, 26(3): 24-26.

路京, 陈建真, 李宗元, 陈如意, 袁小凤. 2012. 连作和轮作模式下杭白菊土壤理化性质及细菌多样性的差异. 中华中医药学刊, 30(7): 1529-1533.

路晓飞, 芦瑛, 李媄, 王云聪. 2012. 生物农药添加剂碱性蛋白酶的工业放大与优化. 中国化工贸易, 4(6): 241

罗菲, 汪涯, 曾庆桂, 颜日明, 张志斌, 朱笃. 2011. 东乡野生稻根际可培养细菌多样性及其植物促生活性分析. 生物多样性, 19(4): 476-484.

罗明, 卢云, 张祥林. 2004. 棉花内生细菌的分离及生防益菌的筛选. 新疆农业科学, 41(5): 277-282.

罗明, 卢云, 张祥林. 2007. 内生拮抗细菌在哈密瓜植株体内的传导定殖和促生作用机制. 西北植物学报, 27(4): 0719-0725.

罗秀针, 施碧红, 郑虹, 吴伟斌, 施巧琴. 2008. 枯草芽胞杆菌 FB123 细菌素的理化性质及抑菌谱的研究. 微生物学杂志, 28(1): 64-67.

罗璋, 陈昌福, 白晓慧, 夏露. 2007. 枯草芽孢杆菌 BHI344 培养条件的优化. 中国饲料, (10): 41-43.

吕静琳, 黄爱玲, 郑蓉, 李殿殿, 吕暾. 2009. 一株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及产酶条件优化. 生物技术, 19(6): 26-29.

吕淑霞, 牛建双, 马镝, 张良, 陈宏权, 张忠泽. 2011. VC 混菌发酵中大菌不同胞外组分对小菌的影响. 食品与生物技术学报, 30(5): 700-704.

吕向阳, 蒋如璋. 1991. 巨大芽孢杆菌淀粉酶基因的克隆及其在枯草杆菌中的表达. 遗传学报 (英文版), 18(2): 185-192.

吕应年, 杨世忠, 牟伯中. 2005. 一种脂肽类生物表面活性剂产生菌的筛选. 微生物学杂志, 25(2): 4-8.

吕志伟, 王瑾, 张文会. 2011. 地衣芽孢杆菌 LCB-8 的紫外诱变及优良菌株的选育. 安徽农业科学, 39(32): 19995-19996.

马春全, 李春英, 邱青波, 吴海燕. 2000. 微生态制剂-MXY892 菌粉的研制. 黑龙江八一农垦大学学报, 12(2): 76-79.

马凡茹, 陈秀蓉, 杨成德, 叶震, 徐长林. 2009. 高寒草地 5 种土壤优势细菌的 16S rDNA 鉴定及其对不

同物质利用初探. 甘肃农业大学学报, 44(6): 117-122.
马冠华, 肖崇刚. 2004. 烟草内生细菌种群动态研究. 微生物学杂志, 24(4): 7-11.
马红娟, 杨秀娟, 阮宏, 杜宜新, 陈福如. 2008. 拮抗细菌对香蕉枯萎病菌的离体抑菌活性研究. 福建农业学报, 23(3): 251-254.
马宏宇, 李菁菁, 祁高富, 喻子牛, 赵秀云. 2010. 蛋白酶产生菌的化学诱变及酶学性质. 华中农业大学学报, 29(6): 737-740.
马利平, 乔雄梧, 高芬, 郝变青. 2006. B 96-II 对 3 种枯萎病的防治效果及拮抗物质初步分析. 华北农学报, 21(4): 99-102.
马明, 郑宏. 1992. 短小芽孢杆菌 289(pBX96) α-淀粉酶的性质. 微生物学报, 32(6): 400-404.
马树宏. 2008. 地衣芽孢杆菌胶囊加硝苯吡啶治疗肠易激综合症 52 例临床观察. 中国现代药物应用, 2(4): 46-47.
马同锁, 田苗珍, 袁红楼, 赵士豪, 薛胜平. 2009. 不同生长环境对 2 种蔬菜内生菌分布的影响. 安徽农业科学, 37(17): 7812-7813.
马向东, 康海霞. 2000. 枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的克隆及表达. 河南农业大学学报, 34(3): 223-226.
马鑫, 郭宏, 张宝国, 王晓, 罗跃青, 刘宇景. 2011. 地衣芽孢杆菌作为饲料添加剂的研究进展. 中国饲料添加剂, 2: 10-13.
马艳, 赵江涛, 常志州, 黄红英, 叶小梅, 张建英. 2006. 西瓜内生枯草芽胞杆菌 BS211 的拮抗活性及盆栽防效. 江苏农业学报, 22(4): 388-393.
马颖辉, 曹龙奎, 李玉秋, 高岩, 王景会. 2011. 枯草芽孢杆菌淀粉酶高产菌株的紫外诱变研究. 农产食品科技, 5(1): 23-26.
苗则彦, 赵奎华, 刘长远, 梁春浩, 王辉, 吕国忠. 2009. 内生细菌 b504 的鉴定及对黄瓜枯萎病的生防作用. 植物保护, 35(6): 73-77.
闵越双, 刘明启, 郑双杰, 葛虹. 2010. 枯草芽孢杆菌淀粉酶酶学性质的研究. 中国科技纵横, (23): 195.
明飞平, 赵培静, 廖春芳, 梁淑娃, 夏枫耿. 2009. 纳豆芽孢杆菌液体发酵条件的优化研究. 现代食品科技, (6): 625-628.
莫宏春, 刘克武, 孟延发, 江琰, 秦岭, 宋贤丽. 2003. 枯草芽孢杆菌 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的纯化及性质. 化学研究与应用, 15(3): 348-350.
慕娟, 问清江, 党永, 李叶昕, 张烁, 李慧惠. 2012. 木聚糖酶的开发与应用. 陕西农业科学, 58(1): 111-115.
倪学勤. 1998. 有益芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 产赖氨酸工程菌研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文.
倪学勤, 曹希亮, 曾东, 周小秋. 2008. 猪源约氏乳酸杆菌 JJB3 和枯草芽孢杆菌 JS01 对仔猪肠道分泌型免疫球蛋白 A 和菌群的影响. 动物营养学报, 20(3): 275-280.
倪学勤, 陈智英, 何明清, 蔡宝祥. 1999. 益生芽孢杆菌对抗生素的敏感性及其质粒的检测. 中国微生态学杂志, 11(4): 203-204.
倪耀娣, 鲁改如, 张庆茹. 2004. 微生态制剂对肉仔鸡免疫器官及抗病力的影响. 兽药与饲料添加剂, (1): 6-7.
聂光军, 薛正莲, 岳文瑾, 肖必青, 陈军. 2006. 不同浓度的秋水仙碱对枯草杆菌产 α-淀粉酶的影响. 安徽工程科技学院学报 (自然科学版), 21(3): 15-17.
聂国兴, 明红, 宋东蓥, 胡晓龙, 高航. 2011. 枯草芽孢杆菌 E79 分批发酵动力学. 化学工程, 39(11): 6-9, 20.

宁福胜, 周军, 康永德. 2001. 微生态制剂在断奶仔猪饲料中应用效果研究. 饲料工业, 22(3): 10-12.
牛丹丹, 徐敏, 马骏双, 王正祥. 2007. 地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的克隆和及其启动子功能鉴定. 中国生物学文摘, 21(5): 25.
牛冬云, 张义正. 2003. 碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件的优化. 食品与发酵工业, 29(5): 28-31.
牛桂兰, 闫建平. 2002. 高毒效杀甜菜夜蛾苏云金芽孢杆菌 WY 毒效杀甜. 中国生物防治, 18(4): 166-170.
牛红榜, 刘万学, 万方浩. 2007. 紫茎泽兰 (*Ageratina adenophora*) 入侵对土壤微生物群落和理化性质的影响. 生态学报, 27(7): 2051-3060.
牛永梅. 2010. 一株高产碱性果胶酶菌株的分离、产酶条件的优化和酶液的初步分离提纯. 新课程(教研版), (5): 261-265.
牛志卿, 刘建荣. 1994. TTC4-脱氢酶活性测定法的改进. 微生物学通报, 21(1): 59-61.
潘风光, 任洪林, 刘海学, 柳增善. 2004. 地衣芽孢杆菌 α-耐高温淀粉酶基因的克隆及原核表达. 内蒙古民族大学学报 (自然科学版), 19(1): 46-49.
潘康成. 1996. 芽孢杆菌 B02 对家兔免疫功能影响的研究. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文.
潘康成, 何明清. 1997. 地衣芽孢杆菌对家兔细胞免疫功能的影响. 四川农业大学学报, 15(3): 368-371.
潘佩平, 周鸿宾. 1995. 茎瘤固氮根瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans*) ORS571 产生的植物激素. 微生物学通报, 22(1): 10-13.
潘志明, 张小荣, 焦新安, 刘文博, 甘军纪, 高崧等. 2003. 鸡沙门氏菌弱毒苗与微生态制剂联合应用的效果. 中国兽医学报, 23(2): 155-156.
彭萍, 李品武, 侯渝嘉, 徐泽. 2007. 不同生态茶园昆虫群落多样性研究. 植物保护, 32(4): 67-70.
彭清忠, 陈军, 陈玲, 彭清静. 2010. 短短小芽孢杆菌启动子筛选载体的构建. 生命科学研究, 14(2): 117-121.
彭清忠, 张惟材. 2002. α-淀粉酶在短短芽孢杆菌中的分泌表达. 生物技术通讯, 13(3): 167-169.
彭细桥, 周国生, 邓正平, 匡传富, 罗宽, 刘红艳. 2007. 烟草青枯病内生拮抗菌的筛选、鉴定及其防效测定. 植物病理学报, 37(6): 670-674.
彭益强, 范恩明, 方柏山. 2007.一株产 NAD+依赖型甘油脱氢酶嗜热杆菌的筛选. 漳州师范学院学报 (自然科学版), 20(4): 88-92.
齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. 2003. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用. 生态学报, 23(8): 1576-1582.
祁红兵, 刘铭, 李红敬. 2003. 产几丁质酶苏云金芽孢杆菌的筛选及其对甜菜夜蛾高毒菌株的增效活性. 江苏农业科学, (6): 61-63.
祁红兵, 刘铭. 2003. 苏云金杆菌菌株产几丁质酶的合成条件研究. 信阳师范学院学报 (自然科学版), 16(1): 42-44.
祁艳霞, 张小辉, 杨明明, 陈玉林. 2012. 产 β-半乳糖苷酶枯草芽孢杆菌 BGJ222 培养条件的初步优化. 中国饲料, (3): 25-27.
钱存柔, 黄仪秀. 1999. 微生物学实验教程 . 北京: 北京大学出版社.
钱晓雍, 沈根祥, 黄丽华, 顾海蓉, 梁丹涛, Pugliese M. 2007. 3 株非致病性镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 菌株对番茄枯萎病的生物防治效果. 上海农业学报, 23(4): 60-62.
乔建军, 杜连祥. 2001. 枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的克隆及其序列分析. 工业微生物, 31(3): 23-24, 28.
乔建军, 路福平, 陈启明, 杜连祥, 耿运琪. 2004. 枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌

中的高效表达. 南开大学学报 (自然科学版), 37(2): 13-17.
秦岭, 刘克武, 莫宏春, 江琰, 国锦林, 刘祝君. 2003. 枯草杆菌 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的分离纯化及部分性质研究. 四川大学学报 (自然科学版), 40(5): 939-944.
秦艳, 李卫芬, 黄琴. 2007. 枯草芽孢杆菌发酵条件的优化. 饲料研究, (12): 70-74.
秦艳, 王青艳, 陆雁, 杨建, 黄日波. 2009. 酸性 α-淀粉酶生产菌株的筛选及酶学性质研究. 酿酒科技, (12): 17-19, 22.
覃君君, 江均平, 李春红, 戴良英. 2013. 基于 pHY300PLK 的分泌表达载体的构建. 湖南农业大学学报 (自然科学版), (1): 52-57, F0003.
邱清华, 姬广海, 魏兰芳, 刘娜, 张世光. 2002. 马铃薯青枯病拮抗菌株的筛选. 云南农业大学学报, 17(3): 228-231.
邱孙全, 杨红, 赵春安, 李海燕. 2009. 一株内生短短芽胞杆菌的鉴定及其抗菌活性研究. 天然产物研究与开发, 21: 30-33.
邱炜, 黄惠琴, 叶建军, 鲍时翔. 2009. 抗香蕉枯萎病放线菌的筛选及菌株 DA07408 的鉴定. 农业现代化研究, 30(1): 126-128.
曲慧东, 孙明, 谷祖敏, 喻子牛, 纪明山. 2008. 辽宁土壤中苏云金芽胞杆菌分布调查. 植物保护, 31(3): 71-74.
权春善, 王军华, 徐洪涛, 范圣第. 2006. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究. 微生物学报, 46(1): 7-12.
全艳玲. 2002. 地衣芽孢杆菌对有害微生物的拮抗作用. 食品科学, 23(8): 67-69.
阙祖俊, 刘赵玲, 李文婷, 毛芝娟. 2010. 一株 α-淀粉酶生产菌的分离鉴定及其产酶条件优化. 浙江万里学院学报, 23(5): 83-89.
任继平, 李德发, 谯仕彦. 2006. 鲁梅克斯 K-1 草粉和纤维素酶对生长猪生长性能及养分消化率的影响. 粮食与饲料工业, (3): 36-38.
任杰, 吕淑霞. 2010. 1 株生防细菌的筛选、鉴定及其抑菌特性的初步研究. 微生物学杂志, 30(2): 33-37.
任香芸, 蔡海松, 林新坚, 陈济琛, 邱宏端. 2007. 嗜热脂肪土芽孢杆菌 CHB1 发酵培养基的优化. 福建农业学报, 22(1): 54-57.
任香芸, 陈济琛, 蔡海松, 林新坚, 邱宏端. 2007. 嗜热脂肪土芽孢杆菌 CHB1 生长特性与培养条件研究. 生物技术, 17(2): 65-68.
任争光, 张志勇, 魏艳敏. 2006. 芽胞杆菌防治园艺植物病害的研究进展. 中国生物防治, 22: 194-198.
阮传清, 陈建利, 刘波, 陈燕萍, 韩文福. 2011. 杨桃与荔枝根区土壤微生物群落磷脂脂肪酸 (PLFAs) 特征分析. 热带作物学报, 32(10) :1903-1909.
莎莉, 苏争先, 黄小红, 邱君志, 关雄. 2003. 微生物几丁质酶的分子生物学研究及其应用. 农业生物技术学报, 11(6): 642-647.
单志琼, 周峻岗, 周宇飞, 袁汉英, 吕红. 2012. 产碱性木聚糖酶菌株的筛选及酶学性质. 遗传, 34(3): 356-365.
邵宗泽, 郭延奎, 喻子牛. 2002. 苏云金芽胞杆菌工程菌伴胞晶体的形态发生. 微生物学报, 42(5): 555-559.
沈德龙, 冯永君, 宋未. 2002. 成团肠杆菌的生物功能多样性及其分类最新进展. 微生物学杂志, 22(1): 40-42, 50.
沈剑华. 2010. “发酵床”养猪的利弊分析. 石河子科技, 4(2): 69-70.
沈锦玉, 沈智华, 尹文林, 曹铮, 叶雪平,潘晓艺, 吴颖蕾. 2004. 饲喂枯草芽孢杆菌对银鲫等水生动物肠道菌群及消化酶活性的影响. 水产学报, (B12): 146-150.

沈萍, 范秀荣, 李广武. 1996. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社.
师福山, 赵德明. 2009. 禽大肠杆菌的分离与 16S rRNA 的鉴定. 中国畜牧兽医, (2): 111-113.
施碧红, 温建新, 吴伟斌, 施巧琴, 吴松刚. 2011. *Bacillus subtilis* FS321 的 α-淀粉酶基因的克隆与表达. 中国农学通报, 27(33): 194-198.
石春芝, 陶天申, 岳莹玉. 2001. 神农架自然保护区九大湖芽胞杆菌资源调查. 氨基酸和生物资源, 23(1): 1-4.
石笛, 杨础华, 张竞立, 黄琼, 黄魁英. 2009. 一株耐热纤维素酶菌株的筛选及酶学性质的研究. 广西轻工业, 25(4): 14-15.
石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 2006. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报, 26(7): 2395-2401.
石晶盈, 刘爱媛, 冯淑杰, 李雪萍, 陈维信. 2007. 番木瓜内生细菌 MG 木瓜内的鉴定及其生防作用. 果树学报, 24(6): 810-814.
石志琦, 胡梁斌, 于淑池, 徐朗莱, 范永坚. 2005. 细菌 P-FS08 的鉴定及其对几种植物病原菌的拮抗作用. 南京农业大学学报, 28(3): 48-52.
史冬燕. 2009. 低温胁迫对拟南芥 G 蛋白突变体 SOD、POD 酶活性和丙二醛含量的影响. 贵州大学学报(自然科学版), 26(2): 14-16.
史应武, 娄恺, 李春. 2009. 天山北坡甜菜内生菌分离鉴定及其动态变化. 生态学报, 29(5): 2375-2382.
史永昶, 姜涌明. 1995. 一些理化因子对 α-淀粉酶构象与活力的影响. 生物化学杂志, 11(2): 205-209.
税欣, 郑连爽. 2007. 产碱性木聚糖酶细菌的筛选及产酶条件的优化. 环境科学与技术, 30(3): 29-31.
宋光明, 沈微, 孙金凤, 饶志明, 方慧英, 诸葛健, 诸葛斌. 2008. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶基因 *chiA* 在枯草芽孢杆菌中的分泌表达. 安徽农业科学, 36(26): 11242-11244, 11247.
宋健, 杜立新, 王容燕, 魏利民, 曹伟平, 王金耀, 冯书亮. 2011. 大茂山地区苏云金芽胞杆菌分布与多样性研究. 中国农学通报, 27(1): 166-169.
宋卡魏, 王星云, 张荣意. 2007. 培养条件对枯草芽孢杆菌 B68 芽孢产量的影响. 中国生物防治, 23(3): 255-259.
宋素琴, 茆军, 顾美英, 张志东, 石玉瑚. 2010. 一株碱性高温 α-淀粉酶产生菌的分离鉴定及其酶学性质初步研究. 新疆农业科学, 47(9): 1803-1807.
宋素琴, 欧提库尔·玛合木提, 张志东, 唐琦勇. 2007. 新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定. 微生物学通报, 34(5): 867-870.
宋文龙. 2013. 枯草芽孢杆菌微生态制剂的研制. 大连: 大连工业大学硕士学位论文.
宋增福, 吴天星, 潘晓东. 2006. 丁酸梭菌对肠道上皮细胞黏附及对鳗弧菌抑制的研究. 中国兽药杂志, 40(8): 9-12.
宋子红, 丁立孝, 马伯军, 李文泽, 梅汝鸿. 1999. 花生内生菌的种群及动态分析. 植物保护学报, 26(4): 309-314.
苏洁, 王耀兵, 杨滴, 关道明. 2007. 绿色荧光蛋白标记的大肠杆菌海水中稳定性研究. 海洋环境科学, 28(4): 395-398.
苏军, 汪莉, 曾子建, 刘启恒, 张炜, 苏道华, 陈明. 1999. 益生素与有机酸结合对肉鸡生产性能影响的研究. 饲料工业, (11): 19-21.
苏宁, 王桂峰, 徐维敏, 衣文平, 王琦, 梅汝鸿. 1998. 蜡质芽孢杆菌超氧化物歧化酶(SOD) 的纯化研究. 农业生物技术学报, 6(3): 235-238.
苏宁, 衣文平, 徐维敏, 王琦, 蔡元呈, 王桂峰, 梅汝鸿. 1999. 蜡质芽孢杆菌超氧化物歧化酶的理化性质研究. 中国微生态学杂志, 11(1): 7-9.

苏旭东, 张伟, 袁耀武, 李英军, 马雪, 杨建新. 2007. 河北省部分地区苏云金芽胞杆菌菌株多样性的研究. 安徽农业科学, 35(18): 5540-5541.

孙常灿, 何晓丽, 杨容, 蒋晶, 陈章宝. 2007. 大豆胰蛋白酶抑制剂微生物发酵灭活研究. 畜禽业, (6): 4-6.

孙海新, 刘训理. 2004. 茶树根际微生物研究. 生态学报, 24(7): 1353-1357.

孙静, 路福平, 刘逸寒, 刘曦, 肖静. 2009. 枯草芽孢杆菌工程菌产中温 α-淀粉酶发酵条件优化. 中国酿造, (5): 65-68.

孙鹏. 2011. 纳豆枯草芽孢杆菌对断奶前犊牛生长性能和免疫功能的影响. 中国畜牧兽医, (1): 243-243.

孙晓棠, 王燕, 龙良鲲, 崔汝强, 姚青, 朱红惠. 2008. 番茄根际微生物种群动态变化及多样性. 微生物学通报, 35(11): 1744-1749.

孙迅, 王宜磊. 1997. 木聚糖酶高产菌株 *Bacillus pumilus* H-101 的筛选及产酶条件的研究. 微生物学杂志, 17(2): 17-22.

孙义, 居正英, 林玲, 杨启银, 周益君. 2008. 茄子黄萎病生防内生细菌 29-12 发酵条件的初步研究. 江苏农业学报, 24(4): 425-430.

孙占斌, 袁行方, 王音娴, 张辉, 张文会, 冯永君. 2012. 黄瓜初花期与结瓜期叶片可培养内生细菌多样性研究. 微生物学通报, 39(6): 764-772.

孙正祥, 纪春艳, 李云锋, 王振中. 2008. 香蕉枯萎病拮抗细菌的分离筛选与鉴定. 中国生物防治, 24(2): 143-147.

檀建新, 陈忠义, 张杰, 黄大昉. 2001. 产几丁质酶菌的分离鉴定及其抑菌作用的初步研究. 植物保护, 27(2): 1-3.

汤保贵, 徐中文, 张金燕, 唐志坚, 张璐, 孙建华. 2007. 枯草芽孢杆菌的培养条件及对水质的净化作用. 淡水渔业, 37(3): 45-48.

唐家毅, 刘婕, 于铁妹, 杨博, 王永华, 张毅. 2008. 一株水产芽孢杆菌的鉴定及其培养基优化的研究. 淡水渔业, 38(6): 26-30.

唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 陈夕军, 童蕴慧. 2005. 地衣芽孢杆菌 w10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质. 中国生物防治, 21(3): 203-205.

唐莉娜, 张秋芳, 刘波, 林营志, 刘丹莹, 史怀, 杨述省, 王国芬. 2008. 有机肥与化肥配施对烤烟土壤微生物群落 PLFAs 动态的影响. 中国农学通报, 24(12): 260-265.

唐小林. 2004. 对我国茶园生态建设的思考. 茶叶, 30(3): 130-131.

唐振华, 吴士雄. 2000. 昆虫抗药性的遗传与进化. 上海: 上海科学技术出版社.

唐志燕, 龚国淑, 刘萍, 邵宝林, 张世熔. 2005. 成都市郊区土壤芽胞杆菌的初步研究. 西南农业大学学报 (自然科学版), 27(2): 188-193.

田宏先, 崔林, 孙振, 王瑞霞. 2002. 内生菌对马铃薯环腐病的田间防效及增产作用. 山西农业科学, 30(1): 73-75.

田涛, 王琦. 2005. 绿色荧光蛋白作为分子标记物在微生物学中的应用. 微生物学杂志, 25(1): 68-73.

田新玉, 王欣. 1997. 碱性纤维素酶的产生条件和一般性质. 微生物学通报, 24(4): 195-198.

田兴山, 张玲华, 周风珍, 李国立, 孙晓刚. 2005. 表达绿色荧光蛋白重组乳酸杆菌的构建及电击转化条件. 华南农业大学学报, 26(3): 117-119.

田雪亮, 单长卷. 2006. 黄瓜种子及幼苗内生细菌分离鉴定. 安徽农业科学, 34(8): 1574-1575.

田亚平, 全文海. 1998. 嗜碱性芽孢杆菌碱性纤维素酶酶系的研究. 食品与发酵工业, 24(3): 1-12.

佟小雪, 牛丹丹, 陈献忠, 石贵阳, 王正祥. 2009. 地衣芽孢杆菌高温 α-淀粉酶异源表达研究. 生物技术,

19(5): 11-13.

童蕴慧, 郭桂萍, 徐敬友, 纪兆林, 陈夕军. 2004. 拮抗细菌对番茄植株抗灰霉病的诱导. 中国生物防治, 20: 187-189.

童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 陈夕军, 卢国新. 2002. 灰葡萄孢拮抗细菌的种类鉴定及生长条件研究. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 23(2): 67-70.

万利, 高翠希. 2005. 生物农药使用的气象条件. 北京农业, 8: 37-37.

汪恩国, 陈克松, 李达林. 2004. 青花菜黑腐病空间分布格局测定及其应用. 中国植保导刊, 24(2): 30-31.

汪海峰, 王井亮, 王翀, 周明. 2012. 一株肠源枯草芽孢杆菌的生长、抗逆和产酶特性分析. 中国畜牧杂志, (17): 66-70.

汪家社, 宋士美, 吴焰玉. 2003. 武夷山自然保护区螟蛾科昆虫志. 北京: 中国科学技术出版社: 1-3.

汪家社. 2006. 武夷山自然保护区螟蛾亚科昆虫的物种多样性. 南京林业大学学报 (自然科学版), 30(3): 98-100.

汪家社. 2007. 武夷山自然保护区水螟亚科昆虫物种多样性研究. 华东昆虫学报, 6(1): 59-63.

汪琳仙, 李德发, 张才乔, 顾宏伟. 1996. 益微制剂对肉仔鸡生长和某些生理指标影响的研究. 动物营养学报, 8(4): 39-44.

汪正兵, 宋慧婷. 2003. 短小芽孢杆菌木聚糖酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究. 生物工程学报, 19(1): 50-55.

王爱华, 殷幼平, 熊红利, 李颜方, 李佳, 贤家旭, 王中康. 2010. 广西柑橘黄龙病植株韧皮部内生细菌多样性分析. 中国农业科学, 43(23): 4823-4833.

王爱民, 高霞莉. 2009. 根癌农杆菌介导的绿色荧光蛋白基因在水稻植株中的表达. 徐州师范大学学报 (自然科学版), 27(2): 91-94.

王超, 陈启, 倪辉, 李利君, 蔡慧农, 苏文金. 2012. 1 株枯草芽胞杆菌的鉴定及其弹性蛋白酶结构研究. 微生物学杂志, 32(3): 13-20.

王诚, 盛清凯, 武英, 李福昌, 郭建凤, 赵红波, 陶海英. 2009. 冬季水泥地面猪舍与发酵床猪舍养猪效果比较. 黑龙江畜牧兽医, (4): 56-57.

王丹敏, 宋桂径. 1995. 产碱性纤维素酶菌株的选育和酶合成基本特性. 微生物学研究与应用, (1): 12-16.

王德, 魏征, 刘佳, 周婷. 2012. 枯草芽孢杆菌 B11-1 产抗白念珠菌物质培养条件的优化. 中国抗生素杂志, 37(9): 678-682.

王冬梅, 周晓峰. 2006. 猪疫病流行及防治分析. 农村实用科技, (10): 32-33.

王芳, 马建华, 张蓉, 赵金霞. 2006. 生物杀菌剂护根宝对西瓜枯萎病菌的抑制试验. 宁夏农林科技, (6): 40, 114.

王刚, 李志强. 2005. 小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯病的拮抗作用. 微生物通报, 32(2): 20-24.

王桂芬, 蒋如璋. 1989. 枯草芽孢杆菌 BF76582——淀粉酶的性质. 微生物学报, 29(2): 124-128.

王海坤. 2004. 美登木内生真菌的分离. 中国民族民间医药杂志, (6): 355-359.

王浩, 绳志雅, 隋新华, 陈文新. 2006. 用 *gfp* 基因标记法研究大豆根瘤菌在大豆根部定殖结瘤情况. 微生物学杂志, 26(2): 1-4.

王红革, 罗进贤. 1997. 地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的诱导表达. 微生物学报, 37(2): 101-106.

王华弟, 孙国昌, 张恒木, 朱黎明. 2007. 水稻条纹叶枯病空间分布格局及抽样技术. 浙江农业学报, 19(5) :360-363.

王慧敏, 孙艷丽, 王建辉. 2009. 生防菌株 E26 对部分生态因子的影响. 中国农业科学, 35(1): 38-41.

王建玲, 赵丛, 杜连祥. 2009. 枯草芽胞杆菌突变株 ZC-7 中性蛋白酶催化区域氨基酸突变导致其活力提高. 生物技术通讯, 20(4): 526-529.
王金玲, 刘晓平, 赵凤艳, 吕长山, 高照亮. 2013. 解磷巨大芽孢杆菌液体发酵培养条件的优化. 中国农学通报, 29(15): 68-72.
王良桂, 徐晨. 2010. 福建武夷山国家级自然保护区木兰科植物资源初探. 福建林业科技, 37(2): 90-93.
王妹, 陈有光, 段平, 段登选, 陈秀丽, 王育峰. 2008. 枯草芽孢杆菌培养基配方优化的研究. 渔业现代化, 35(6): 44-47.
王娜, 许雷. 2007. 棉花黄萎病、枯萎病拮抗细菌的筛选及其生长特性的研究. 植物保护, 33(6): 39-43.
王朋朋, 常娟, 王平, 左瑞雨, 尹清强. 2009. 蛋白酶和淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质分析研究. 中国畜牧杂志, (21): 48-51.
王清奎, 黄玉明, 张志国. 2003. pt 法-基质理化性质的快速测定方法. 北方园艺, 1: 41-41.
王秋红, 陈亮, 林营志, 朱育菁, 蓝江林, 杨淑佳, 刘波. 2007. 福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究. 中国农业科学, 39(8): 1675-1687.
王蓉. 2008. 老鼠簕内生放线菌的分离鉴定活性评价及其类群分析. 海口: 海南大学硕士学位论文.
王善利, 马景芝, 袁勤生. 2006. Bt 培养基配比及伴孢晶体纯化条件的优化. 华东理工大学学报（自然科学版), 32(3): 285-289.
王涛, 王和. 2008. 细胞壁缺陷枯草杆菌酸溶性小分子芽胞蛋白及芽胞形成. 贵阳医学院学报, 33(2): 144-147.
王万能, 全学军, 周跃钢, 胡勇. 2004. 关于植物病害生物防治. 重庆工学院学报, 18(2): 50-53.
王巍杰, 王胜春, 尹丹. 2012. 响应面法优化地衣芽孢杆菌发酵树叶饲料提高纤维素酶活力的研究. 饲料工业, (17): 11-14.
王伟东, 刘建斌, 牛俊玲, 吕育财, 崔宗均. 2006. 堆肥化过程中微生物群落的动态及接菌剂的应用效果. 农业工程学报, 22(4): 148-152.
王炜, 付建红. 2002. 一株产纤维素酶细菌液体发酵条件的初步研究. 新疆农业科学, 39(1): 20-22.
王小兵, 骆永明, 刘五星, 李振高. 2011. 花生青枯病内生拮抗细菌的鉴定、抗菌活性及其田间防效. 中国生物防治学报, 27(1): 88-92.
王晓红, 茆军, 博力, 顾英美, 王伟, 段继华. 2007. 低温淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质研究. 农产品加工 • 学刊, (1): 7-9.
王学聘, 戴莲韵, 杨光滢, 张万儒. 1999. 我国西北干旱地区森林土壤中苏云金芽胞杆菌生态分布. 林业科学研究, 12(5): 467-473.
王亚茹, 范云六. 2001. 枯草芽孢杆菌中性植酸酶的纯化和酶学性质. 微生物学报, 41(2): 198-203.
王彦波. 2009. 池塘芽孢杆菌的筛选、鉴定和生长特性研究. 水生态学杂志, 2(1): 91-94.
王瑶瑶, 韩烈保, 曾会明. 2008. 禾本科植物内生菌研究进展. 生物技术通报, (3): 33-38.
王弋博, 刘向阳, 李三相, 李勃, 张海林. 2003. 用紫外诱变及紫外＋硫酸二乙酯复合诱变方法选育高产异淀粉酶菌株. 青海大学学报（自然科学版), 21(4): 7-10.
王莹, 范坚强, 包可翔, 王金华, 王志. 2011. 一株片烟中纤维素降解菌的筛选鉴定及其初步应用研究. 现代农业科技, (8): 25-28.
王莹莹, 王德培, 李可乐, 魏征, 刘鹏. 2012. 纳豆芽孢杆菌增殖培养的研究. 饲料工业, (12): 50-54.
王颖, 马海乐, 何荣海, 刘斌, 耿静静. 2012. 豆粕混菌液体发酵制种技术试验研究. 粮食与饲料工业, (6): 39-42.
王则金, 苏大庆, 杨艳芬, 黄晋之, 童金华, 林启训. 2004. 生物抑制剂处理结合低温冷藏对龙岩保鲜质

量的影响. 中国农学通报, 20(6): 43-46.

王振华, 潘康成. 2007. 不同浓度中药对枯草芽孢杆菌体外生长的影响. 中国兽医杂志, 43(10): 44-45.

王震, 郭爱玲, 冯莉. 2007. 绿色荧光蛋白基因在植病研究中的应用. 中国农学通报, 23(6): 493-496.

王政逸. 1990. 拮抗立枯丝核菌的细菌菌株筛选及其防治试验. 浙江农业大学学报, 16(增刊 2): 191-195.

王忠彦, 黄英, 胡永松, 胡佩. 1997. 一株耐高温 SOD 产生菌的筛选及酶学特性. 微生物学报, 37(4): 307-311.

王子旋, 刘波, 林营志, 刘国红. 2012. 新疆土壤芽胞杆菌采集鉴定及其分布多样性. 福建农业学报, 27(2): 187-195

位孟聪, 杨瑞. 2009. 发酵床养猪技术简介. 科学种养, (12): 32-33.

魏春, 刘洋, 周俊利, 谢丽萍, 俞国伟. 2013. *Paenibacillus pabuli* WZ008 的自絮凝及其种子培养基优化对碱性果胶酶发酵的影响. 发酵科技通讯, 42(1): 4-7.

魏海雷, 王烨, 张力群, 唐文华. 2004. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析. 植物病理学报, 34(1): 80-85.

魏雪生, 陈颖, 牛静怡. 2006. 天津地区土壤中苏云金芽胞杆菌调查. 天津农学院学报, 13(3): 30-32.

魏艳丽, 李红梅, 李纪顺, 扈进冬, 杨和同. 2011. 产碱性纤维素酶芽孢杆菌 ZA-05 的分离及功能基因克隆. 湖北农业科学, 50(18): 3859-3863.

魏艳丽, 李纪顺, 扈进冬, 张广志, 李红梅, 杨合同. 2013. 降解阿维菌素耐高温菌株 AZ11 的分离及降解特性. 山东科学, (4): 16-19.

魏艳丽, 周红姿, 扈进冬, 陈凯, 黄玉杰, 杨和同. 2009. 巨大芽孢杆菌 AP25 内切葡聚糖酶基因的克隆及序列测定. 山东科学, 22(5): 22-26.

魏仲军, 李兴元, 王晓娥, 王国军, 邓根生. 2002. 姜瘟病穴田间分布规律及药剂防治试验. 中国农学通报, 18(3) :106-108.

温俊, 孙鸣. 2008. 枯草芽胞杆菌制剂对牙鲆生长性能的影响. 饲料研究, (3): 62-64.

文才艺, 吴元华, 田秀玲. 2004. 植物内生菌研究进展及其存在的问题. 生态学杂志, 23(2): 86-91.

文凤云, 王国永, 李晓丽, 董淑丽, 孙平, 李文巧. 2011. 多粘芽孢杆菌 Dw-6 菌株培养条件的优化及其发酵液抑菌活性的初步研究. 西北农业学报, 20(4): 30-34.

文倩, 林启美, 赵小蓉, 李贵桐, 赵沛一. 2008. 北方农牧交错带林地、耕地和草地土壤微生物群落结构特征的 PLFAs 分析. 土壤学报, 45(2): 321-327.

邬敏辰. 1996. 中温 α-淀粉酶性质的研究. 天津微生物, (1): 25-29.

吴蔼民, 顾本康, 付正擎, 胡波. 2000. 内生菌对棉花黄萎病的田间防效及增产作用. 江苏农业科学, (5): 38-39.

吴丹, 王艳飞. 2002. 碱性成纤维细胞因子在枯草芽孢杆菌 BS224 中的表达. 生物技术通讯, 13(6): 439-442.

吴凤笋, 郭素琴, 李文刚. 2012. 土壤中带芽孢除臭菌株的分离筛选及除臭试验. 黑龙江畜牧兽医, (23): 71-73.

吴襟, 张树政. 2008. 巨大芽孢杆菌 β-淀粉酶基因的克隆、表达和酶学性质分析. 生物工程学报, 24(10): 1740-1746.

吴俊罡, 张秉胜, 刘吉华, 秦贵江, 王梅雪, 张红霞, 庚涛. 2003. 一株枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化. 饲料广角, 11: 24-26.

吴立新, 吴祖芳. 2011. 短小芽孢杆菌脂肪酸羟基化发酵特性与培养条件优化. 食品与生物技术学报, 30(4): 602-608.

吴丽艳, 段继强, 范志祥, 杜威, 梁雪妮, 刘飞虎. 2007. 亚麻脱胶菌的分离、筛选和鉴定. 云南大学学报

(自然科学版), 29(4): 419-423.
吴良银, 李梅, 侯敢, 黄迪南. 2010. 青霉菌培养液中抗氧化物质的初步分析. 食品与发酵工业, 3: 55-59.
吴凌伟, 王水兴, 严有明. 2003. 利用甘蔗渣固态发酵生产木聚糖酶. 食品与发酵工业, 29(8): 100-102.
吴琦, 刘世贵, 王红宁. 2003. 芽孢杆菌植酸酶研究进展. 中国饲料, (12): 11-14.
吴琦, 王红宁, 胡勇, 邹立扣. 2004. *Bacillus subtilis* WHNB02 植酸酶 phyC 基因的克隆及序列分析. 生物技术, 14(3): 2-4.
吴青录, 秦秀丽. 2012. 枯草芽孢杆菌液体培养条件的研究. 吉林农业 (学术版), (4): 64-65.
吴胜莲, 刘惠知, 周映华, 周小玲, 高书锋, 胡新旭, 缪东. 2011. 纳豆芽孢杆菌发酵条件的优化. 湖南农业科学, 10: 16-19.
吴晟旻, 范伟平. 2005. *B. licheniformis* NG521-1 发酵培养基优化的研究. 南京工业大学学报 (自然科学版), 27(2): 25-29.
吴顺章, 杨忠耿, 翁良森, 吴剩勇, 郑淑端. 2000. 多效唑调控兰竹荔枝花果试验. 中国果树, 4: 30-31.
吴向华, 刘五星. 2006. 胶冻样芽孢杆菌培养条件及发酵工艺的优化. 江苏农业科学, (4): 155-158.
吴新宇, 董英. 2010. 乳酸脱氢酶高产菌株的分离筛选与初步鉴定. 食品与机械, (1): 35-37, 80.
吴学超, 曹新江, 冀志霞, 陈守文. 2008. 聚 γ-谷氨酸高产菌的选育与培养基优化. 微生物学通报, 35(10): 1527-1531.
吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 胡宝兰. 2006. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究. 土壤学报, 43(4): 642-647.
吴跃开. 2006. 植物促生根圈细菌诱导植物系统抗性的研究进展. 中国森林病虫, 25(2): 24-29.
吴作为, 黄晓玮, 张克勤. 2004. 植酸酶酶学特性研究进展. 西南农业学报, 17(5): 455-460.
伍建榕, 韩素芬, 朱有勇. 2006. 云南兰科植物菌根内生真菌种类研究. 西南林学院学报, 26(3): 5-10.
伍泽堂, 张刚元. 1990. 脱落酸、细胞分裂素和丙二醛对超氧化物歧化酶活性的影响. 植物生理学通讯, (4): 30-32.
伍赠玲, 邱君志, 张新艳, 李训波, 关雄. 2004. 苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因定位研究进展. 福建农林大学学报 (自然科学版), 33(1): 75-79.
武爱民, 江正强, 韦赘. 2008. 枯草芽孢杆菌胞外二氢硫辛酰胺脱氢酶的纯化. 中国农业大学学报, 13(1): 16-19.
武波, 蒋承建, 陈以涛, 唐纪良. 2001. 一株产耐高温碱性蛋白酶菌株的筛选. 食品与发酵工业, 27(6): 16-20.
夏飚. 2009. 发酵床对猪免疫抑制病的有效防治. 中国畜牧兽医文摘, (1): 59.
夏剑辉, 王水兴. 2003. 蜂房芽孢杆菌利用蔗渣发酵产木聚糖酶的研究. 江西师范大学学报 (自然科学版), 27(1): 80-84.
夏立秋, 王文龙, 丁学知, 周国庆. 1996. 蜡质芽孢杆菌超氧化物歧化酶稳定性研究. 常德高等专科学校学报, 8(1): 8-10.
夏正俊, 顾本康, 吴蔼民, 傅正擎. 1997. 棉株植物内生菌诱导棉花抗黄萎病过程中同工酶活性的变化. 江苏农业学报, (13): 99-101.
鲜乔, 蒋家新, 张拥军, 李铁萍, 安晓欢. 2009. 高活性几丁质酶产生菌的筛选及鉴定. 中国计量学院学报, 20(3): 274-277, 282.
肖郁明, 张义正. 1996. 环太芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*) 的转化和中性蛋白酶. 四川大学学报 (自然科学版), 33(1): 106-109.
肖怀秋, 李玉珍, 兰立新. 2008. 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* CNMC-0014 深层摇瓶发酵生产中性蛋白酶

——培养基组分及培养条件对酶生物合成的影响. 食品科学, 29(5): 259-264.
肖黎明, 王卫卫, 郭燕. 2008. 1 株产碱性纤维素酶软化芽孢杆菌 IS-B4 的选育及产酶条件的研究. 食品与发酵工业, 34(5): 59-62.
谢凤行, 张峰峰, 周可, 赵玉洁. 2010a. 原生质体诱变选育高纤维素酶活性枯草芽孢杆菌的研究. 华北农学报, 25(5): 211-214.
谢凤行, 张峰峰, 周可, 赵玉洁. 2010b. 利用原生质体融合技术构建植酸酶、纤维素酶枯草芽孢杆菌工程菌的研究. 天津农业科学, (5): 21-24, 37.
谢凤行, 赵玉洁, 周可, 张峰峰, 李亚玲. 2009. 产胞外淀粉酶枯草芽孢杆菌的分离筛选及其紫外诱变育种. 华北农学报, 24(3): 78-82.
谢光蓉, 乔代蓉, 曹毅. 2012. 重组枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶基因工程菌构建与表达. 食品与发酵科技, 48(3): 13-17.
谢航, 邱宏端, 王秀彬, 陈冬花. 2008. 地衣芽孢杆菌降解水产养殖中残余饵料的特性研究. 福建水产, (3): 31-35.
谢晶, 葛绍荣, 陶勇, 高平, 刘昆, 刘世贵. 2004. 多粘类芽胞杆菌 BS04 拮抗成分分离纯化及其特性. 化学研究与应用, 16(6): 775-777.
谢敬. 2010. 纤维素酶的研究进展. 化学工业与工程技术, 31(5): 46-49.
谢永芳, 梁亦龙, 王会会, 张珂, 常志超, 李雪梅. 2009. 大蒜内生菌抑菌蛋白提取研究. 江苏农业科学, (1): 122-123.
谢月霞, 杜立新, 李瑞军, 王容燕, 王金耀, 曹伟平, 宋健, 冯书亮. 2008. 河北省不同生态区的苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因多样性研究. 中国农学通报, 24(12): 407-409.
谢钟琛, 李建, 施青. 2009. 福建省柑橘黄龙病危害及其流行规律研究. 中国农业科学, 42(11): 3888-3897.
辛国芹, 徐海燕, 武香玉, 汪孟娟, 谢全喜, 谷巍. 2012. 一株抑菌芽胞杆菌的分离鉴定及产细菌素性能检测. 畜牧与饲料科学, 33(5): 3-6.
辛嘉英, 李树本, 徐毅, 王来来, 沈润南, 尉迟力. 2000. 脂肪酶产生菌的筛选及不对称水解合成 S-(+)-萘普生. 工业微生物, 30(3): 31-35.
熊国如, 张翠英, 刘庆丰, 李顺德, 何月秋. 2009. 枯草芽胞杆菌 XF-1 粗蛋白抑菌活性初步研究. 植物保护, 35(4): 92-95.
胥兵, 陈惠, 韩学易, 官兴颖, 吴琦. 2006. 枯草芽孢杆菌 C-36 纤维索酶的纯化及酶学性质. 四川农业大学学报, 24(4): 398-401.
胥海东, 王永泽, 王金华. 2011. 枯草芽孢杆菌产蛋白酶的发酵培养基优化. 食品与发酵科技, 47(4): 77-81.
徐华勤, 肖润林, 邹冬生, 宋同清, 罗文, 李盛华. 2007. 长期施肥对茶园根际土壤微生物群落功能多样性的影响. 生态学报, 27(8): 3355-3361.
徐辉, 林家富, 费忠安, 费保进, 余英鹏, 乔代蓉, 曹毅. 2012. 不同生境产脂肪酶菌株的筛选及多样性. 应用与环境生物学报, 18(3): 455-459.
徐进, 何礼远, 冯洁, 滕建勋, 孟兆军. 2003. 生防细菌对马铃薯青枯病的防病增产作用研究. 植物保护, 19(5): 40-42.
徐刘平, 尹燕妮. 2006. 拮抗细菌对土传病原菌的作用机理. 中国生物防治, 22(2): 10-14.
徐秋芳, 姜培坤, 沈泉. 2005. 灌木林与阔叶林土壤有机碳库的比较研究. 北京林业大学学报, 27(2): 18-22.
徐桃献,杨家兴. 1994. 微生物 β-淀粉酶代替部分大麦芽生产啤酒新工艺. 微生物学通报, 21(6): 336-339.

徐威, 苏昕. 1997. 碱性蛋白酶产生菌的筛选及发酵条件考查. 生物技术,7(3):22-24.

徐幼平, 蔡新忠, 祝小祥. 2013. 水旱作物轮作田块土壤中微生物群落结构的 PLFA 法比较分析.浙江农业学报, 25(5) :1056-1061.

许国焕, 吴月嫦, 付天玺, 张丽, 江永明, 龚全. 2008. 微生物制剂对奥尼罗非鱼生长及饲料表观消化率的影响. 中国饲料, (21): 26-28.

许杰. 2009. 桃树细菌性穿孔病空间分布型和抽样技术研究. 中国植保导刊, (7) :34-37.

许秀淡, 郑少泉, 许家辉, 刘惠玉. 1998. 熏硫对采后龙眼果皮衰老若干生理变化的影响. 福建农业学报, 13(3): 35-38.

许英俊, 薛泉宏, 邢胜利, 周永强, 张晓鹿, 郭志英, 杨斌, 林超峰, 孙敬明. 2008. 3 株放线菌对草莓的促生作用及对 PPO 活性的影响. 西北农业学报, 17(1): 129-136.

许正宏, 陶文沂. 2005. *Bacillus pumilus* WL-11 木聚糖酶 A 的纯化、鉴定及其底物降解方式. 生物工程学报, 21(3): 407-413.

许正宏, 陶文沂. 2006. *Bacillus pumilus* WL-11 蛋白酶对其木聚糖酶合成的影响. 食品与发酵工业, 32(11): 1-5.

薛冬, 姚槐应, 黄昌勇. 2005. 植茶年龄对茶园土壤微生物特性及酶活性的影响. 水土保持学报, 19(2): 84-87.

薛冬, 姚槐应, 黄昌勇. 2007. 茶园土壤生物群落基因多样性. 应用生态学报, 18(4): 843-847.

薛立, 邝立刚, 陈红跃, 谭绍满. 2003. 不同林分土壤养分、微生物与酶活性的研究. 土壤学报, 40(2): 280-284.

薛掌林, 张述斌, 刘瑞生, 苟想珍, 王必慧. 2008. 鸡新城疫病毒与传染性支气管炎病毒同胚培养的试验研究. 中国畜牧兽医, 35(7): 85-86.

鄢洪德, 申屠樟萍, 钱俊青. 2013. 超临界 CO_2 诱变枯草芽孢杆菌的研究. 发酵科技通讯, 42(3): 5-8, 25.

闫凤兰, 卢峥, 朱玉琴. 1996. 肉仔鸡饲喂枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 效果的研究. 动物营养学报, 8(4): 34-38.

闫沛迎, 陈秀蓉, 薛莉, 杨成德. 2008. 枯草芽孢杆菌 B2 种子液发酵条件的研究. 甘肃农业大学学报, 43(2): 110-113.

晏立英, 周乐聪, 谈宇俊, 单志慧, 沈明珍, Leonid Chernin. 2005. 油菜菌核病拮抗细菌的筛选和高效菌株的鉴定. 中国油料作物学报, 27(2): 55-57.

燕红, 杨谦, 潘忠诚. 2007. 一株地衣芽孢杆菌对稻草降解作用的研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 33(4): 360-366.

燕红, 杨谦, 王希国. 2007. 一株产纤维素酶细菌 X10-1-2 的鉴定. 工业微生物, 37(3): 42-43.

燕红, 杨谦. 2007. 地衣芽孢杆菌对麦麸降解作用的研究. 林产化学与工业, 27(4): 97-102.

燕红, 杨谦. 2008. 蜡样芽孢杆菌对稻草的降解作用. 哈尔滨工业大学学报, 40(8): 1242-1246.

杨朝晖, 陶然, 曾光明, 肖勇, 邓恩建. 2006. 多粘类芽孢杆菌 GA1 产絮凝剂的培养基和分段培养工艺. 环境科学, 27(7): 1444-1449.

杨迪, 李艳, 张喜红, 袁均林, 贺红武. 2009. 重组苏云金芽孢杆菌丙酮酸脱氢酶克隆及表达条件的优化. 化学与生物工程, 26(4): 39-42.

杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 1999. 植物促生细菌诱导水稻对白叶枯病抗性的初步研究. 植物病理学报, 31: 91-92.

杨合同, 陈凯, 李纪顺, 周红姿, 赵晓燕. 2003. 重组巨大芽孢杆菌在小麦根际的定殖及其对植物真菌病害的防治效果. 山东科学, 16(3): 12-17.

杨合同, 任欣正. 1990. 姜瘟病生物防治试验初报. 山东科学, 3(4): 42-46.

杨合同, 唐文华, 迟建国, 徐砚珂, 王加宁. 2002. 植病生防菌株 B1301 的种类鉴定及其对生姜青枯病的作用机理和防治效果. 中国生物防治, 18(1): 21-24.
杨慧林, 王坤, 廖瑜玲, 王斌, 林影, 潘力. 2012. 解淀粉芽孢杆菌 *pts GHI* 基因的敲除及缺陷株生长特性. 华南理工大学学报 (自然科学版), 40(8): 95-100.
杨敬辉, 朱桂梅, 潘以楼, 庄义庆. 2009. 水稻内生颉颃细菌的筛选及生防机理研究. 江西农业学报, 21(5): 70-73.
杨立华, 赵述淼, 冷一非, 梁运祥. 2010. 一株凝结芽孢杆菌产芽孢条件的研究. 中国酿造, (5): 96-98.
杨丽娜, 杨明明, 龚月生. 2012b. 产耐热性纤维素酶菌株的分离·鉴定及其酶学性质研究. 安徽农业科学, 40(14): 8103-8105.
杨丽娜, 张建, 龚月生. 2012a. 响应面法优化 *Bacillus subtilis* NP29 产纤维素酶发酵条件的研究. 饲料工业, (14): 48-52.
杨丽珠, 马明. 1993. 携有巨大芽孢杆菌淀粉酶基因的两种质粒在枯草杆菌中产酶. 生物化学杂志, 9(2): 141-145.
杨柳, 魏兆军, 朱武军. 2008. 产纤维素酶菌株的分离、鉴定及其酶学性质研究. 微生物学杂志, (4): 65-69.
杨敏. 2002. 仙草多糖对大鼠肝匀浆脂质过氧化的实验研究. 浙江预防医学, 14(12): 4-5.
杨群, 谢金防, 韦启鹏. 2009. 浅谈发酵床养猪的优缺点. 江西畜牧兽医杂志, (4): 24-25.
杨水英, 李振轮, 青玲, 江艳冰. 2007. 产几丁质酶烟草内生细菌的筛选及产酶条件研究. 西北农业学报, 16(4): 223-227.
杨文艳, 庞金钊, 杨宗政, 刘欣. 2008. 杨木 APMP 废液的生物转化及应用. 安徽农业科学, 36(29): 12986-12988.
杨武英, 上官新晨, 蒋艳, 吴少福, 沈勇根, 郭诚志. 2005. 鲤鱼鱼精蛋白抑菌机理探讨. 江西农业大学学报, 27(4): 508-512.
杨秀松, 张新平. 2012. 枯草芽孢杆菌产果胶裂解酶培养基优化研究. 上海第二工业大学学报, 29(2): 105-111.
杨艳, 刘萍, 马鹏飞, 孙君社. 2007. 巨大芽孢杆菌 MPF-906 对养鱼水质净化的初步研究. 水产养殖, 28(3): 6-8.
杨永强, 惠嫣婷, 谢海强, 刘若余. 2012. 混合菌种发酵制备槐树叶饲料工艺研究. 山地农业生物学报, 31(6): 533-537.
杨宇, 吴元华, 郑亚楠. 2006. 瓜类枯萎病拮抗放线菌的筛选. 北方园艺, (4): 177-179.
姚翠萍, 王和玉, 杨帆, 林琳, 王莉. 2010. 枯草芽孢杆菌液态培养条件优化及其代谢产物分析. 酿酒科技, (8): 43-45.
叶辉, 冯春, 程郢, 朱苏文, 程备久. 2008. 几丁质酶基因表达载体 pET-chiB 的构建及其在大肠杆菌中的诱导表达. 激光生物学报, 17(3): 384-390.
叶枝青, 姚建铭. 2001. 离子注入选育高效植物病原真菌拮抗菌 JA. 激光生物学报, 10(4): 293-297.
易杰祥, 吕亮雪, 刘国道. 2006. 土壤酸化和酸性土壤改良研究. 华南热带农业大学学报, 12(1): 23-28.
易有金, 罗坤, 罗宽, 刘仁明. 2007. 内生枯草芽孢杆菌 B-001 菌株内生定殖研究及生物学特性. 核农学报, 21(4): 349-352.
易有金, 尹华群, 罗宽, 邱德文. 2007. 烟草内生短短芽胞杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效. 植物病理学报, 37(3): 301-306.
殷晓敏, 陈弟, 吴红萍, 郑服从. 2008. 香蕉内在拮抗细菌研究 I——菌株 B215 的分离及分子鉴定. 热带作物学报, 29(5): 636-640.

殷幼平, 李佳, 林亚玉, 陈世伟, 王中康. 2012. 柑橘黄龙病隐症寄主九里香内生细菌分离及功能鉴定. 微生物学通报, 39(10): 1418-1427.
尹崇山, 李相安, 乔益磊. 1999. “普乐宝”在肉鸡日粮中的应用效果. 中国家禽, 21(8): 20-20.
尹红梅, 吴迎奔, 张德元, 王震, 陈薇, 贺月林. 2012. 发酵床中耐高温地衣芽孢的分离鉴定及产酶分析. 家畜生态学报, 33(6): 97-102.
尹焕才, 薛小平, 谢玉为, 唐蕊华, 苏婧, 宋凯. 2008. 静态强磁场对枯草芽胞杆菌的影响研究. 现代生物医学进展, 8(3): 471-474.
印杨, 伊艳杰, 李瑞芳, 李佳明, 崔伟伟, 李玉冲. 2013. 响应面法优化巨大芽孢杆菌 RB10 的发酵培养条件. 生物技术, 23(2): 84-88.
游玲, 魏琴, 郭华, 张云. 2012. 山苍子 (*Litsea cubeba*) 可培养内生细菌的多样性. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 404(4): 210-216.
游玟娟. 2010. 紫外线诱变选育酸性α-淀粉酶高产菌株. 安徽农学通报, 16(11): 70-71.
游庆红, 尹秀莲. 2010. 产耐热纤维素酶菌株的筛选及其酶学性质研究. 安徽农业科学, (7): 3331-3332.
游银伟, 尤升波, 岳寿松. 2007. 产角蛋白酶芽胞菌 YYW-1 的鉴定及产酶性质分析. 农业生物技术学报, 15(3): 543-544.
于传宗, 慕宗杰, 特日格勒. 2008. 植物种群空间分布格局的研究方法. 畜牧与饲料科学, 29(5): 40-42.
于翠, 吕德国, 秦嗣军, 杜国栋, 刘国成. 2007. 大青叶樱桃根际微生物种群结构及其变化动态. 果树学报, 24(3): 298-302.
于宏安, 郭早霞. 2013. 地衣芽孢杆菌复配苯噻酮菌株对脐橙溃疡病的作用机理与控病研究. 现代园艺, (9): 3-5.
于佳民, 张建梅, 张文, 谷巍. 2013. 凝结芽孢杆菌产芽孢发酵条件的优化. 中国饲料, (8): 19-21.
于树, 汪景宽, 李双异. 2008. 应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响. 生态学报, 28(9): 4221-4227.
余超, 肖荣凤, 刘波, 林乃铨, 陈璐. 2010. 生防菌 FJAT-346-PA 的内生定殖特性及对香蕉枯萎病的防治效果. 植物保护学报, 37(6): 493-498.
余永涛, 王建华, 赵清梅, 宋毓民, 张志敏, 崔忠华, 耿果霞, 李勤凡. 2009. 甘肃棘豆中产苦马豆素内生真菌的分离与鉴定. 西北农林科技大学学报, 2(37): 40-46,51.
於叶兵. 2007. 芽孢杆菌对斑节对虾消化和免疫的影响. 上海: 上海水产大学硕士学位论文.
俞宁, 申一淋. 2009. 枯草芽孢杆菌替代抗生素治疗仔猪腹泻试验. 西昌学院学报, 23(4): 22-24.
袁保红, 杜青平, 邓祖军. 2007. 小连翘内生真菌种群分布及其抗菌性研究. 广东药学院学报, 23(3): 307-311.
袁超, 崔乐芳, 王瑞明. 2011. 地衣芽孢杆菌在麸曲中产中性蛋白酶发酵工艺条件的研究. 酿酒科技, (3): 40-42.
袁虹霞, 李洪连, 王振跃. 1998. 利用土壤拮抗性微生物防治棉花枯萎病. 中国生物防治, 14(4): 156-158.
袁科平, 邹世平, 李谷, 何力, 周群兰. 2011. 一株水产地衣芽孢杆菌的鉴定及培养基优化. 福建农林大学学报 (自然科学版), 40(1): 69-73.
袁小平, 王静, 姚惠源. 2004. 枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶的纯化与性质研究. 食品与发酵工业, 30(8): 55-59.
袁小平, 王静, 姚惠源. 2005. 小麦麸皮阿魏酰低聚糖对红细胞氧化性溶血抑制作用的研究. 中国粮油学报, 20(1): 13-16.
岳东霞, 张要武, 陈融, 许长蔼. 2008. 荧光假单胞菌工程菌株的构建及对黄瓜枯萎病的防治效果. 华北

农学报, 23(6): 101-104.

岳寿松, 尤升波, 游银伟, 王翠萍, 周晓凤. 2011. 温度和碳源对分解羽毛的枯草芽孢杆菌 YYW-1 生长特性的影响. 山东农业科学, (2): 61-64.

曾军, 石国荣, 张湘元, 熊兴耀. 2009. 珙桐叶水提物的抗氧化性能. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 35(3): 295-298.

翟梅枝, 高智辉, 徐文涛, 王伟, 李晓明. 2008. 核桃内生真菌 G8 菌株的分离鉴定及抑菌活性. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 4(28): 92-97.

翟秋梅, 薛卫巍, 薛永常, 郑来久. 2010. 枯草芽孢杆菌 FM208849 产果胶酶发酵条件的优化. 大连工业大学学报, 29(2): 93-97.

詹发强, 包慧芳, 王炜, 崔卫东, 龙宣杞, 杨蓉, 林瑞峰. 2009. 地衣芽孢杆菌 ws-6 产纤维素酶条件优化. 生物技术, 19(5): 59-61.

湛方栋, 陆引罡, 关国经, 唐远驹, 张永春, 黄建国. 2005. 烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究. 土壤学报, 42(3): 51-51.

张超范, 魏萍. 2005. 复合微生态制剂对肉仔鸡局部免疫调节及降血脂效果分析. 饲料博览, (5): 30-32.

张春杨, 牛钟相. 2002. 益生菌剂对肉用仔鸡的营养、免疫促进作用. 中国预防兽医学报, 24(1): 51-54.

张铎, 谢莉, 张蕾, 张丽萍, 赵宝华. 2008. 棉花黄萎病拮抗内生菌的筛选鉴定及抗菌物质研究. 河北师范大学学报 (自然科学版), 32(5): 673-678.

张帆, 王向东, 蒋文举, 王依娜, 张望, 陈娇. 2010. 制酒废水培养絮凝剂产生菌 X15 的培养条件优化及菌种鉴定. 科技创新导报, (36): 2-3.

张锋, 李英梅, 李瑞婷, 陈志杰. 2010. 枣树缩果病空间分布格局和抽样技术研究. 植物保护, 36(4): 123-126.

张福官, 盛祖勋, 钱根林, 彭会建, 马琪, 许卯生. 2010. 发酵床养猪技术的应用试验. 上海畜牧兽医通讯, (4): 42-43.

张国龙, 李德发. 1994. 益微制剂对断奶仔猪生产性能, 氮平衡, 粪中大肠杆菌数及血清 SOD 酶活性的影响. 饲料研究, (9): 2-6.

张国赏, 吴文鹃,潘仁瑞. 2000. 气相色谱—质谱法检测细胞脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用. 合肥学院学报: 自然科学版, (4): 92-96.

张国洲. 2002. 害虫抗药性及其治理. 安徽农业科学, 30(4): 512-514.

张海涵, 唐明, 陈辉, 杜小刚, 郑华. 2007. 不同生态条件下油松 (*Pinus tabulaeformis*) 菌根根际土壤微生物群落. 生态学报, 27(12): 5463-5470.

张海涵, 唐明, 陈辉. 2009. 黄土高原典型林木根际土壤微生物群落结构与功能特征及其环境指示意义. 环境科学, 30(8): 2432-2437.

张海燕, 吴天祥. 2006. 微生物果胶酶研究进展. 酿酒科技, 9: 82-85.

张红见, 赵静, 张虎. 2010. 短小芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus* UN-31-C-42) 对青海藏系羊蹄脱毛效果研究. 食品研究与开发, 31(8): 167-169.

张宏宇, 邓望喜, 喻子牛. 2000. 苏云金芽胞杆菌的遗传多样性, II. 杀虫晶体蛋白及其基因型. 遗传, 22(2): 125-128.

张洪涛, 徐田枚, 艾山江·阿布都拉. 2007. 新疆有毒焮麻内生菌的分离及AP-PCR与ERIC-PCR分析. 中国微生物学杂志, 19(3): 265-267.

张华勇, 李振高, 王俊华, 潘映华. 2003. 红壤生态系统下芽胞杆菌的物种多样性. 土壤, (1): 45-47.

张集慧, 王春兰, 郭顺星, 陈建民, 肖培根. 1999. 兰科药用植物的 5 种内生真菌产生的植物激素. 中国

医学科学院学报, 21(6): 460-465.

张家华. 2007. 改造老茶区的根本之路——浅议创建无公害绿色环保茶园. 福建茶叶, 3: 17-18.

张建梅, 李晓颖, 谢全喜, 于佳民, 汪官保, 李传友, 谷巍. 2012. 复合微生态制剂对断奶仔猪生产性能、粪便菌群及血液指标的影响. 中国微生态学杂志, 24(9): 796-800.

张建宁. 2009. 耐热 α-淀粉酶产生菌枯草芽孢杆菌抗噬菌体的选育. 安徽农业科学, 37(12): 5372-5374.

张建云, 谷立坤, 崔树军, 武秀琴. 2015. 解淀粉芽孢杆菌中性植酸酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达. 中国酿造, (5): 116-119.

张健, 张琳. 2011. 苏云金芽孢杆菌氮代谢的研究进展. 生命科学仪器, 9(2): 33-37.

张杰, 刘永生, 马庆生. 2004. 地衣芽孢杆菌 GXN151 的纤维素酶基因 *cel9A* 的序列分析及 *cel48A* 的定位. 沈阳农业大学学报, 35(3): 235-239.

张锦芳, 籍小涛. 2001. D-葡萄糖脱氢酶活力测定方法的研究——短小芽孢杆菌在 D-核糖生产中的应用. 天津轻工业学院学报, (3): 37-40.

张蕾, 石新丽, 李敏, 张根伟, 张丽萍. 2010. 短小芽孢杆菌 TY079 产抗菌物质的发酵培养基研究. 河北省科学院学报, 27(2): 47-50.

张礼星. 1996. 耐高温 α-淀粉酶的研究概况. 江苏食品与发酵, (3): 29-31.

张丽丽, 梁革梅, 曹广春, 高希武, 郭予云. 2010. 增强 Bt Cry 毒素杀虫作用的重要途径: 增效因子的利用及晶体蛋白的遗传改良. 环境昆虫学报, 32(4): 525-531.

张丽苹, 徐岩. 2002. 酸性 α-淀粉酶生产菌株的选育的初步研究. 工业微生物, 32(4): 11-14.

张丽霞, 黄开红, 周剑忠, 李莹, 王英, 单成俊. 2009. 枯草芽胞杆菌 FR4 对才后草莓的保鲜效果. 江西农业学报, 21(9): 124-127.

张利敏, 张利平. 2009. 木槿根瘤内生放线菌的分离及系统发育分析. 现代农业科学, (2): 5-6.

张燎原, 洪欲强, 陈双, 胡开辉. 2012. 以葡萄糖和木糖为双底物生物合成乙偶姻的条件优化. 化学与生物工程, 29(7): 30-35.

张灵玲, 关怡, 黄勤清, 关雄. 2008. 武夷山土壤中分离的 Bt 杀蚊新菌株. 寄生虫与医学昆虫学报, 15(2) 82-85.

张灵启, 李卫芬, 余东游. 2008. 芽孢杆菌制剂对断奶仔猪生长和免疫性能的影响. 黑龙江畜牧兽医, (3): 37-38.

张璐, 齐希猛, 刘婷婷, 易润华. 2011. 一株拮抗芒果炭疽菌海洋细菌的鉴定和发酵培养基优化. 广东海洋大学学报, (4): 75-80.

张漫莉, 耿新伟, 王梦婷, 蒋磊, 赵辅昆, 赵玮. 2013. 纤维素酶EGA基因在枯草芽孢杆菌中的表达及其产物性质研究. 浙江理工大学学报, 30(3): 389-393.

张敏, 胡晓, 万津瑜, 雷欣雨, 赵丹萍. 2010. 高产几丁质酶的枯草芽孢杆菌诱变育种及发酵条件研究. 中国农学通报, 26(11): 279-283.

张敏, 沈德龙, 饶小莉, 曹凤明, 姜昕, 李俊. 2008. 甘草内生细菌多样性研究. 微生物学通报, 35(4): 524-527.

张明焱, 沈微, 饶志明, 方慧英, 诸葛斌, 诸葛健. 2009. 地衣芽孢杆菌普鲁兰酶编码基因的鉴定. 生物学杂志, 26(2): 8-10.

张念海, 易安妮, 丛莉, 吴希阳. 2011. 侧孢芽孢杆菌 2002 的培养特性及发酵条件优化. 食品研究与开发, 32(3): 152-156.

张庆华, 陈营, 陆承平. 2001. 绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌在温暖水体的存活及稳定性. 水生生物学报, 25(3): 251-255.

张庆宁. 2009. 生态养猪模式中发酵床优势细菌的微生物学性质及其应用研究. 山东农业科学, (4): 99-105.
张日俊, 潘淑媛, 白永义, 王广秋, 王淑云. 2005. 微生物饲料添加剂益生康对肉仔鸡营养代谢与免疫功能的调控机理. 中国农业大学学报, 6: 71-77.
张若寒, 卢国洪, 沈凌君. 2002. 丙酸铵复合物对不同贮存时间高水分玉米防霉效果的研究. 中国饲料, 21: 7-9.
张松鹏, 杨建州, 张洪勋. 2002. 经高浓度味精废水驯化的 B.t. 菌株伴胞晶体特性及其活性成分研究. 生物技术通报, (2): 38-41.
张薇, 魏海雷, 高洪文, 胡跃高. 2005. 土壤微生物多样性及其环境影响因子研究进展. 生态学杂志, 24(1): 48-52.
张伟, 李冠, 娄恺. 2010. 极端耐热木聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的整合表达. 生物技术, (1): 15-18.
张伟伟, 鲁绯, 张金兰, 汪建明, 高丽华. 2010. 食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展. 中国酿造, (5): 1-4.
张熹, 祖国仁, 孙浩, 孔繁东. 2011. 芽胞杆菌 B-09 产胞外多糖培养基优化及多糖黏度性质. 中国酿造, (1): 74-77.
张霞, 张杰, 李国勋, 黄大昉, 陈中义. 2005. 绿色荧光蛋白标记荧光假单胞菌 P303 及其生存能力检测. 植物保护学报, 32(3): 280-286.
张晓云, 李宝庆, 郭庆港, 鹿秀云, 李杜增, 马平. 2011. 生防枯草芽孢杆菌 CAB-1 抑菌蛋白产生条件及其稳定性研究. 中国农业科技导报, 13(2): 59-64.
张晓舟, 徐剑宏, 李顺鹏. 2005. 植病生防芽胞杆菌的分离筛选与初步鉴定. 土壤, 37(1): 85-88.
张昕, 张炳欣, 喻景权, 张震, 沈卫峰, 陈振宇, 石江. 2005. 生防菌 ZJY-1 及 ZJY-116 的 *gfp* 标记及其在黄瓜根围的生态适应性. 应用生态学报, 16(11): 2144-2148.
张昕, 张立钦, 林海萍, 张炳欣. 2007. 引入黄瓜根围的 2 株生防菌株的生态效应. 浙江林学院学报, 24(6): 649-653.
张秀环, 梅文莉, 戴好富. 2009. 白木香内生真菌枝顶孢属两菌株的挥发油成分. 微生物学通报, 1: 37-40.
张彦, 车建美, 刘波, 唐乐尘. 2011. 蜡样芽孢杆菌 ANTI-8098A 在番茄内的定殖和对青枯病的防治研究. 中国生物防治学报, 27(2): 221-227.
张英, 郭良栋, 刘润进. 2003. 都江堰地区丛枝菌根真菌多样性与生态研究. 植物生态学报, 27(4): 537-544.
张颖, 王刚, 郭建伟, 王美南,杨之为. 2007. 利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病的初步研究. 植物病理学报, 37(1): 105-108.
张尤新, 王桂忱. 1997. 胞外蛋白酶对外源基因表达的影响. 锦州医学院学报, 18(4): 25-28.
张玉辉, 王戌晋, 张仁数, 张小峰, 江翰. 2010. 复合菌在饲料发酵中的初步研究. 饲料博览, (12): 23-26.
张长龄, 华静月, 王东, 郑启宏. 1993. 青枯菌的菌种保存. 植物保护, 1: 39-41.
张志刚, 裴小琼, 吴中柳. 2009. 嗜热脂肪土芽孢杆菌木聚糖酶基因的合成及其在大肠杆菌中的表达. 应用与环境生物学报, 15(2): 271-275.
张志焱, 徐海燕, 杨军方. 2005. 枯草芽孢杆菌固体发酵培养基的优化. 饲料博览, (9): 34-36.
张志元, 罗永兰, 官春云. 2005. 油菜种子内生菌的检测及杀菌消毒处理方法. 湖北农业科学, (1): 52-55.
张志忠, 吕柳新, 黄碧琦, 林义章. 2005. 西瓜枯萎病防治技术研究进展. 中国蔬菜, (7): 38-40.
张竹青, 罗宽. 1999. 烟草青枯病生防细菌发酵培养条件研究. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 25 (2): 143-146.
章小洪, 汪琨, 朱廷恒, 崔志峰. 2013. 解淀粉芽孢杆菌 BW-13 培养基和培养条件优化. 浙江工业大学

学报, 41(1): 35-39.
赵达, 刘伟成, 裘季燕, 刘霆, 傅俊范. 2008. 枯草芽孢杆菌 b03 液体发酵条件的优化. 华北农学报, 23(2): 205-209.
赵东, 牛广杰, 彭志云, 杨蓉, 陈亮. 2010. 包包曲中 5 株枯草芽孢杆菌的分离与初步鉴定. 中国酿造, (8): 65-68.
赵健, 高晓丹, 邱荣洲, 翁启勇. 2007. 应用均匀设计优化生防细菌 ZB-6 发酵培养基组分及条件研究. 福建农业学报, 22(4): 341-345.
赵锦斌, 张亚芝. 2009. 微生态发酵床养猪的优点. 畜牧兽医科技信息, (4): 80.
赵铭钦, 李晓强, 王豹祥, 邱立友, 李芳芳, 郑艳燕. 2008. α-淀粉酶和蛋白酶高产菌株的诱变选育. 烟草科技, (8): 53-57.
赵秋敏, 陈月华, 蔡峻, 卢伟. 2006. 一株产几丁质酶、抑真菌的侧孢芽孢杆菌. 中国生物防治, 22(增刊): 42-46.
赵瑞, 江木兰, 胡小加, 姚晓飞. 2007. 培养条件对枯草芽胞杆菌TU100生长和产生抗菌物质的影响. 中国油料作物学报, 29(1): 69-73.
赵瑞香, 周艳. 2009. 副猪嗜血杆菌病的病因分析及其防治. 养殖技术顾问, (7): 75-75.
赵珊. 2008. 高温乳糖酶高产菌株发酵条件优化及酶制剂的研究. 河北农业大学硕士学位论文.
赵淑琴, 杨孝朴, 胡先望. 2011. 嗜热脂肪芽孢杆菌中普鲁兰酶的分离纯化. 甘肃农业大学学报, 46(4): 133-138.
赵望锋, 周晶. 2011. 枯草芽孢杆菌产淀粉酶条件的优化. 湖北农业科学, 50(11): 2315-2318.
赵绪光, 高秀峰, 郑雪妮, 李永生. 2010. 重组嗜碱耐盐芽孢杆菌 (XJU-1) 乙醛脱氢酶 *aldA* 基因在工程菌 BL21(DE3) 中的表达和酶学性质研究. 酿酒科技, (7): 21-23.
赵妍, 邵兴锋, 屠康, 陈继昆. 2007. 枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*) B10 对采后草莓果实病害的抑制效果. 果树学报, 24(3): 339-343.
赵艳, 张晓波, 郭伟, 洪坚平. 2009. 草地早熟禾根际胶质芽孢杆菌培养条件研究. 草地学报, (6): 822-825.
赵银娟, 魏炜. 2008. 一株海洋来源的高活性 Bt 菌的生物学特性研究. 微生物学杂志, 28(4): 43-46.
赵荧, 刘宝琦. 1998. 地衣芽孢杆菌高温 α-淀粉酶的组成及光谱学性质. 微生物学通报, 25(4): 210-212.
赵之伟, 沙涛, 杨发蓉. 1992. 云南水稻根际微生物的生态学研究. 见: 中国科学技术协会首届青年学术年会云南卫星会议论文集. 昆明: 云南科学技术出版社: 149-153.
甄静, 郭直岳, 谢宝恩, 李冠杰, 刘莹莹, 慕琦. 2012. 枯草芽孢杆菌 XK-1 产芽孢条件的优化. 中国农业通报, 28(27): 146-151.
郑贺云, 黎志坤, 李超, 张鲜姣, 胡建伟, 朱红惠. 2012. 新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析. 微生物学通报, 39(7): 1031-1043.
郑华, 欧阳志云, 易自力, 赵同谦, 王效科, 苗鸿, 彭延柏. 2004. 红壤侵蚀区恢复森林群落物种多样性对土壤生物学特性的影响. 水土保持学报, 18(4): 137-141.
郑华军, 鲍晓明, 侯爱华, 杨国梁, 沈煜, 高东. 2002. 地衣芽孢杆菌 α-乙酰乳酸脱羧酶的纯化及酶学性质. 山东大学学报, 37(2): 180-183.
郑舒文, 段辉. 2001. 味精废水综合处理的研究. 微生物学杂志, 21(3): 31-33.
郑滔, 刘娥. 1998. 英球形芽孢杆菌 C3-41 超氧化物歧化酶的特性. 微生物学通报, 25(6): 322-324.
郑雪芳, 葛慈斌, 林营志, 刘建, 刘波. 2006. 瓜类作物枯萎病生防菌 BS-2000 和 JK-2 的分子鉴定. 福建农业学报, 21(2): 154-157.

郑雪芳, 刘波, 蓝江林, 苏明星, 卢淑娴, 朱昌雄. 2011. 微生物发酵床对猪舍大肠杆菌病原生物防治作用的研究. 中国农业科学, 44(2): 4728-4739.

中华人民共和国国家标准: 饲用植酸酶活性的测定分光光度法, QB/T 18634—2002.

中华人民共和国行业标准: 工业酶制剂通用试验方法, QB/T 1803-93, 1994.

钟敏, 赖崇德, 涂国全. 2005. 链霉菌 702 发酵液对水果的防腐保鲜作用初探. 江苏农业大学学报, 27(1): 25-28.

钟万芳, 姜丽华. 2003. 苏云金杆菌以色列亚种几丁质酶基因的克隆及序列分析. 遗传学报(英文版), 30(4): 364-369.

钟万芳, 阎文昭, 蔡平钟, 吴淑华, 方继朝. 2008. 苏云金芽孢杆菌 *kurstaki* 亚种几丁质内切酶基因的生物信息学分析. 江苏农业学报, 24(6): 815-819.

钟卫鸿, 叶海仁, 陈建孟, 宋艳绒. 2005. 应用绿色荧光蛋白基因标记细菌进行生物膜结构定量化新方法. 环境科学, 26(4): 160-163.

周国勤, 杜宣, 吴伟. 2006. 纳豆芽孢杆菌对鱼类非特异性免疫功能的影响. 水利渔业, 26(1): 101-103.

周国庆, 夏立秋, 丁学知, 王文龙. 1999. 芽孢杆菌超氧化物歧化酶的热和 pH 稳定性研究. 常德师范学院学报, 11(3): 62-63.

周煌凯, 龚月生, 杨明明, 张云雁, 宋秀平. 2010. 耐碱性短小芽孢杆菌木聚糖酶在枯草杆菌中的表达及发酵条件优化. 饲料工业, 31(14): 25-29.

周剑, 虞龙. 2005. 产 L-乳酸凝结芽孢杆菌发酵条件的初步研究. 氨基酸和生物资源, 27(1): 70-73.

周婧, 高增贵, 何秀玲, 庄敬华, 张小飞, 吴海云. 2008. 甜瓜枯萎病拮抗内生细菌筛选研究. 北方园艺, (2): 225-227.

周俊初, 史巧娟, 谢波. 2001. 绿色荧光蛋白基因 (*gfp*) 在华癸中生根瘤菌与紫云英共生固氮作用研究中的应用. 中国科学基金, (5): 302-305.

周丽娜, 苏昕, 梁莉丽, 钱林艺. 2006. 产碱性纤维素酶嗜碱芽孢杆菌 AH-8 的研究. 微生物学杂志, 26(3): 35-39.

周丽萍, 徐军. 2007. 巨大芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的重组和表达研究. 中国现代医学杂志, 17(2): 172-174.

周丽萍, 赵燕, 王卉放, 丁建霞. 2004. 枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶的克隆和表达. 江苏大学学报 (医学版), 14(1): 7-10.

周鸣, 刘云国, 李欣, 徐卫华, 樊霆, 牛一乐. 2006. 地衣芽胞杆菌对 Cr6+的吸附动力学研究. 应用与环境生物学报, 12(1): 84-87.

周涛, 肖亚中, 李妍妍, 洪宇植, 王永中. 2007. 茜草内生菌的分离鉴定及其抗菌活性物质研究. 生物学杂志, 24(2): 9-12.

周卫川, 林晶, 肖琼. 2011. 武夷山自然保护区陆生贝类物种多样性研究. 福建林业科技, 38(3): 1-7.

周文斌. 2002. α-乙酰乳酸脱羧酶高产菌株的选育及产酶条件的研究. 食品科学, 23(10): 57-59.

周盈, 陈琳, 柴鑫莉, 喻子牛, 孙明. 2007. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究. 微生物学报, 47(6): 1076-1079.

周映华, 李秋云, 曾艳, 吴胜莲, 缪东. 2007. 益生菌蜡状芽孢杆菌发酵条件及培养基的优化. 饲料研究, (10): 56-58.

周长梅, 戴长春, 王晓云, 李颖, 赵奎军. 2011. 四川盆地部分地区土壤中苏云金芽胞杆菌分离与 *cry* 基因鉴定. 植物保护, 37(2): 20-24.

朱红, 常志州, 王世梅, 黄红英, 陈欣, 费辉盈. 2007. 基于畜禽废弃物管理的发酵床技术研究: Ⅰ发酵床剖面特征研究. 农业环境科学学报, 26(2): 754-758.

朱红梅, 周涵韬, 张赛群, 曹宜, 刘波. 2006. 肠毒性大肠杆菌的绿色荧光蛋白转化及表达研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 45: 43-46.

朱洪, 常志州, 叶小梅, 费辉盈. 2008. 基于畜禽废弃物管理的发酵床技术研究: Ⅲ 高湿热季节养殖效果评价. 农业环境科学学报, 27(1): 354-358.

朱辉, 丁延芹, 田方, 姜远茂, 杜秉海. 2008. 多粘类芽孢杆菌 SC2 *xynD* 和 *gluB* 的克隆及序列分析. 生物技术通报, (4): 171-174, 184.

朱剑宏, 王忠彦, 胡承, 胡永松. 2000. 碱性脂肪酶产生菌的诱变及产酶条件的研究. 四川大学学报, 37(3): 488-490.

朱金良, 陈跃, 钟雪明, 王华弟. 2012. 油菜菌核病发生流行与气象因素关系及预测模型研究. 中国农学通报, 28(25): 234-238.

朱梦. 2010. 普鲁兰酶产生菌的筛选及其酶学性质的研究.海口: 海南大学硕士学位论文.

朱明恩. 2010. 规模化猪场猪巴氏杆菌病综合防制. 四川畜牧兽医, (9): 49-50.

朱卫民, 吴宁一. 1992. 枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达及其产物的分泌. 微生物学报, 32(4): 296-298.

朱文淼, 肖敏. 1996. 枯草芽孢杆菌 BS12 乳酸脱氢酶的分离纯化与部分性质的研究. 生物技术, 6(2): 23-25.

朱屋彪, 蔡燕飞, 邓强, 张焜, 赵肃清. 2008. 降解香蕉秆制备酒精的工艺研究. 现代化工, 28(2): 150-152.

朱育菁, 车建美, 肖荣凤. 2007. 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* Schl.) 的生长特性. 中国农学通报, 23(8): 373-376.

朱育菁, 陈璐, 蓝江林, 苏明星, 刘波. 2009. 茶树内生菌的分离鉴定及其生防功能初探. 福建农林大学学报 (自然科学版), 38(2): 129-134.

朱育菁, 刘波, Sengonca C, 等. 2000. 高效生物杀虫剂BtA的毒性与残留研究. 中国生物防治, 16: 43-46.

朱育菁, 刘波, 林抗美, 葛慈斌, 肖荣凤. 2004. 蜡状芽胞杆菌 ANTI-8098A 生物杀菌制剂在连作重病区对茄子青枯病的防效测定. 中国植保导刊, 24(11): 8-11.

朱育菁, 王秋红, 陈璐, 蓝江林. 2008. 龙眼内生菌的分离与脂肪酸鉴定. 亚热带植物科学, 37(4): 22-25.

朱越雄, 曹广力, 郁金芳, 周保金. 2001. 桑园土壤芽胞杆菌分析. 江苏蚕业, (4): 5-7.

祝继强, 鹿兆国. 2013. 杨树黑斑病的空间分布型及防治对策. 吉林林业科技, (3): 33-35.

祝小, 耿秀蓉, 潘康成, 吴敏峰. 2007. 枯草芽孢杆菌 Pab02 产纤维素酶活性的研究. 饲料研究, (1): 61-63.

庄铁成, 林鹏, 陈仁华. 1997. 武夷山不同森林类型土壤异养微生物数量与类群组成. 厦门大学学报 (自然科学版), 36(2): 293-298.

庄铁成, 林鹏, 陈仁华. 1998. 武夷山不同森林类型土壤细菌、丝状真菌优势菌属的初步研究. 土壤学报, 35(1): 119-123.

訾楠, 沈微, 石贵阳, 王正祥. 2009. 地衣芽孢杆菌生麦芽糖 α-淀粉酶的基因克隆与鉴定. 应用与环境生物学报, 15(1): 130-133.

邹克扣, 王红宁, 吴琦, 赵海霞. 2004**.** 植酸酶 *phyC* 基因表达载体的构建及其在 *E. coli* 中的表达. 生物技术, (3): 11-14

邹敏, 周常勇. 2005. 柑桔黄龙病病原和检测方法研究进展. 植物保护, 31(003): 10-14.

邹雨坤, 张静妮, 杨殿林, 陈秀蓉. 2011. 不同利用方式下羊草草原土壤生态系统微生物群落结构的 PLFA 分析. 草业学报, 20(4): 27-33.

左雅慧, 丁之铨. 1999. 苏云金芽孢杆菌培养条件及晶体蛋白提纯方法初探. 植物保护, 25(4): 32-34.

Adachi T, Yamagata H, Tsukagoshi N, Udaka S. 1990. Use of both translation initiation sites of the middle wall protein gene in *Bacillus brevis* 47. J Bacteriol, 1990, 172: 511.

Agaisse H, Lereclus D. 1995. How does *B. thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. Journal of Bacteriol, 177(21): 6027-6032.

AhlholmJ U, Helander M, Henriksson J. 2002. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees . Evolution Int J Org Evolution, 56(8): 1566 -1573.

Ahn Y B, Beaudette L A, Trevors J T. 2001. Survival of a GFP-labeled polychlorinated biphenyl degrading psychrotolerant *Pseudomonas* spp. In 4 and 22℃ soil microcosms. Microbial Ecology, 42(4): 614-623.

Alana A, Alkorta I, Dominguez J B. 1990. Pectinlyase activityin a *Penicillum italicum* strain. Applied and Environmental Microbiology, 56: 375-3759.

Algam A, 谢关林, 李斌, 郝晓娟, Jef Coosemans, 刘波. 2006. 利用芽孢杆菌在温室环境中控制番茄青枯病. 植物病理学报, 36(1): 18-24.

Ali B, Sabri A N, Ljung K, Hasnain S. 2008. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). World Journal of Microbiology Biotechnology, 25(3): 519-526.

AlkortaI, Garbisu C, Llama M J, Juan L S. 1998. Industrial applications of pectic enzymes-a review. Process Biochem, 33(1): 21-28.

Amaan R L, Ludwig W, Schleiffer K H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rew., 59: 143-146.

Andrewartha H G, Birch C L. 1954. The distribution and abundance of animals. Chicago: University of Chicago Press.

Angela S, Birgit R, Gabriele B. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. Microbiol, 50(4): 239-249.

Antier P, Minjares A, Roussos S. 1993. Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. Enzyme Microbial Technol, 15: 254.

Antonio C, Giovanna S, Gaetano B C, Immacolata R, Caterina R, Chiara I. 2005. Chryseobacterium indologenes bacteraemia in a diabetic child. J Med Microbiol, 54(7): 677-680.

Antony R, Krishnan K P, Laluraj C M, Thamban M, Dhakephalkar P K, Engineer A S, Shivaji S. 2012. Diversity and physiology of culturable bacteria associated with a coastal Antarctic ice core. Microbiological Research, 167(6): 372-380.

Anuratha C S, Gnanamanickam S S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanaecearum* in India with antagonistic with antagonistic bacteria. Plant Soil, 124: 109-116.

Arana I, Irizar A, Seco C, Muela A, Fernández-Astorga, Barcina I. 2003. Gfp-tagged cells as a useful tool to study the survival of Escherichia coli in the presence of the river microbial community. Microbial Ecology, 45(1): 29-38.

Araujo W L, Marcon J, Maccheroni W J, Elsas J D V, Vuurde J W, Azevedo J L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Appl Environ Microbiol, 68(10): 4906-4914.

Archna G, Kaushik C P, Kaushik A. 2000. Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; α, β, γ and δ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil. Soil Biology&Biochemistry, 32: 1803-1805.

Arutchelvan V, Kanakasabai V, Elangovan R, Nagarajan S, Muralikrishnan. 2006. Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. Journal of Hazardous Materials B, 129: 216-222.

Ash C, Priest F G, Collins M D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Antonie van Leeuwenhoek, 64: 253-260.

Asis C A, Adach K. 2004. Isolation of endophytic diazotroh *Pantoea* agglomerant and nondiazotroph

Entrobacter asburiae from sweetpotato stem in Japan. Applied Microbiology, 1(38): 19-23.

Awad M, Saadaoui L, Rouis S, Tounsi S, Jaoua S. 2007. Differentiation between *Bacillus thuringiensis* strains by *gyrB* PCR-Sau3AI fingerprinting. Molecular Biotechnology, 35: 171-177.

Ayyadurai L, Pavindra N P, Sreehari R M, Ayyadurai N, Naik P R, Rao M S, Kumar R S, Samrat S K, Manohar M, Sakthivel N. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. Journal of Applied Microbiology, 100(5): 926-937.

Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol., 10: 411-421.

Barae T, Daniel V D L. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phyto-remediation of water- soluble, volatile, organic pollutants. Nat Biotechnol, 22: 583-588.

Basile F, Voorhees K J, Hadfield T L. 1995. Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts.Applied & Environmental Microbiology, 61(4): 1534-1539.

Batrakov S G, Rodionova T A, Esipov S E, Polyakov N B, Sheichenko V I, Shekhovtsova N V, Lukin S M, Panikov N S, Nikolaev Y A. 2003. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids, 1634(3): 107-115.

Bavykin S, Lysov Y, Zakhariev V, Kelly J J, Jackman J, Stahl D A, Cherni A. 2004 . Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. Journal of Clinical Microbiology, 42(8): 3711-3730.

Beatty P H, Suan E J. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. Canadian Journal of Microbiology, 48: 159-169.

Beg Q K, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal G S. 2000. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QGl1-3. World J Microbiol Biotechnol, 16: 211.

Ben-Dove. 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol, 63(12): 4883-4890.

Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora R A, Urich A, Hallmann J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol Ecol, 51(2): 215-229.

Bergsma-Vlami M, Prins M E, Staats M, Raaijmakers J M. 2005. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing pseudomonas species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied&Environmental Microbiology, 71(2): 993-1003.

Bernardo V R, Jacquie M M, Robert A C, Chance V, Eckersall D, Jones P W, Dougan G. 2000. Susceptibility of calves to challenge with *Salmonella typhimurium* 4/74 and derivatives harbouring mutations in htrA or purE. Microbiology, 146(11): 2775-2783.

Bertollo P. 2001. Assessing landscape health: A case study from northeastern Italy. Environmental Management, 27(3): 349-365.

Bhatia R, Dogra R C, Sharma P K. 2002. Construction of green fluorescent protein(GFP) -marker strains of Bradyrhizobium for ecological studies. Journal of Applied Microbiology, 93(5): 835-839.

Bibi F, Chung E J, Jeon C O, Chung Y R. 2011. *Bacillus graminis* sp. nov., an endophyte isolated from a coastal dune plant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61: 1567-1571.

Birgit R, Ulrike P, Helmut S, Angela S. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plant to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Applied and Environment Microbiology, 68(5): 2261-2268.

Bloemberg G V, Kolter R, Otoole G A, Lugtenberg BJJ, Kolter R. 1997. Green fluorescent protein as a marker

for *Pseudomonas* spp. Applied and Environmental Microbiology, 63(11): 4543-4551.

Borge D, Ulia W, Lisbeth H, Jensen B R, Sjoholm C. 1990. Cloning of *aldB*, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. Journal of Bacteriology, 4315-4321.

Bossio D A, Girvan M S, Verchot L, Bullimore J, Borelli T, Albrecht A, Scow K M, Ball A S, Pretty J N, Osborn A M. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. Microbial Ecology, 49(1): 50-62.

Brand-williams W, Cuvelier M E, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie, 28(1): 25-30.

Bravo A, Miranda R, Gómez I, Soberón M. 2002. Pore formation activity of *Cry1Ab* toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from Manduca sexta midgut cell microvilli. Biochimica Et Biophysica Acta, 1562(1-2): 63-9

Bressan W, Broges M T. 2004. Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize. Bio Control, 3(49): 315-322.

Bruhlmann F. 1995. Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. Applied and Environmental Microbiology, 61: 3580-3585.

Burhan A, Goekhan N C, Oemer C, Ashabil A, Osman G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38(10): 1397-1403.

Busby J N, Landsberg M J, Simpson R M, Jones S A, Hankamer B, Hurst M R H, Lott J S. 2012. Structural Analysis of Chi1 Chitinase from Yen-Tc: The Multisubunit Insecticidal ABC Toxin Complex of Yersinia entomophaga. Journal of Molecular Biology, 415(2): 359-371.

Cabral C M, Cherqui A, Pereira A, Simoes N. 2004. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain az29. Appl. Envir. Microbiol, 70(7): 3831-3838.

Campbell G L, Bedford M R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: a review. *Canadian* Journal of Animalence, 72(3): 449-466.

Castaldo D J, 程伟. 1991. 抗生素和益生菌的结合效应. 国外畜牧学: 猪与禽, (4): 26-32.

Castillo U, Gary A S, Ford E J, Hess W M, Porter H, Jensen J B, Albert H, Robison R. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by streptomyces NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. Microbiology, 148: 2675-2685.

Cavazzoni V, Adami A, Castrovilli C. 1998. Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. British Poultry Science, 39(4): 526-529.

Chak K F, Chao D C, Tseng M Y, Kao S S, Tuan S J, Feng T Y. 1994. Determination and Distribution of cry-Type Genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. Appl Environ Microbiol, 60(7): 2415-2420.

Chak K F, Young Y M. 1990. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Taiwan. Proc Natl Sci Counc Repub China B, 14(3): 175-182.

Chandrashekhara, Satthyanarayana N, Saligrama A, Kestur N, Shetty N P, Shetty H S. 2007. Endophytic bacteria from different plant origin enhance growth and induce downy mildew resistance in pearl millet. Asian Journal of Plant Pathology, 1(1): 1-11.

Chen F C, Tsai M C, Peng C H, Chak K F. 2004. Dissection of cry gene profiles of *Bacillus thuringiensis* isolates in Taiwan. Curr Microbiol, 48(4): 270-275.

Chester K. 1993. The problem of acquired physiological immunity in plants. Quarterly Review of Biology, 8(3): 275-324.

Choi C W, Kim S C, Hwang S S, Choi B K, Ahn H J, Lee M Y, Park S H, Kim S K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided

comparison. Plant Science, 163(6): 1161-1168.

Chun J, Bae K S. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. Antonie Leeuwenhoek, 78: 123-127.

Clay K, Holah J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. Science, 285(5434): 1742-1744.

Clerck E D, Vanhoutte T, Hebb T, Geerincak J, Devos J, Vos P D. 2004. Isolation, characterization and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. Applied and Environmental Microbiology, 70(6): 3664-3672.

Cohen-Kupiec R, Chet I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. Current Opinion of Biotechnology, 9: 270-277.

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clement C, Barka E A. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. Appl Environ Microbiol, 71: 1685-1693.

Conn V M, Franco C M M. 2004. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. Appl Environ Microbiol, 70: 1787-1794.

Connell J H. 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs: high diversity of trees and corals is maintained only in a nonequilibrium state. Science, 199: 1302-1310.

Cook R J, Bruckart W L, Coulson J R, Goettel M S, Humber R A, Lumsden R D. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. Bio Control, 7: 333-351.

Cook R J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Ann Rev Phytopathol., 31: 53-80.

Coorevits A, Dinsdale A E, Heyrman J, Schumann P, Van Landschoot A, Logan N A, De Vos P. 2012. *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev. Int J Syst Evol Microbiol, 62(Pt 5): 1121-1127.

Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, Schnepf S, Rie J V, Lereclus D L, Baum J, Dean D H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 62(3): 807-813.

Dahllof I, Baillie H, Kjelleberg S. 2000. RpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. Applied and Environmental Microbiology, 66(8): 3376-3380.

Dailey F E, Berg H C. 1993. Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA, 90: 1043-1047.

Daisuke I, Shoji H, Mari K, Yusaku M, Erica D, Kazunari Sei, Shinji T, Masanori F. 2008. Degradation of Bis (4-hydroxyphenyl) methane(bisphenol F) by *Sphingobium yanoikuyae* strain FM-2 isolated from river water. Appl Envir Microbio, 74(2): 352-358.

Daisy B H, Strobel G A, Castillo U, Justin B R. 2002. Naphthalene, an insect repellent is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. Microbiology, 1(48): 3737-3741.

Damodara R M , 陈国泽 (译), 胡又佳 (校). 2006. 通过亲和色谱从地衣芽孢杆菌中分离α-淀粉酶. 中国医药工业杂志, 37(3): 149.

Dearaujo J M, Dasil V A A C, Azevedo J L. 2000. Isolation of endophytic actinmycetes from roots and leaves of maize (*Zea may* L.) Braz Arch Biol Technol, 43: 447-451.

Demirkan E S, Adachi M M, Higasa T, Utsumi S. 2005. α-Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. Process Biochemistry, 40(8): 2629-2636.

Denise K Z, Pat L N, Beth H, Feng Z, Daniel K, Phyllis H. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic

Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. Appl Envir Microbiol, 68(5): 2198-2208.

Dey K K, Lin H, Borth W B, Melzer M J, Hu J S. 2012. A highly sensitive single-tube nested pcr assay for the detection of *Pineapple mealybug* wilt associated *virus*-2 (PMWaV-2). Journal of Virological Methods, 183(2): 215-8.

Dickinson D N, Duc M T L, Satomi M, Winefordner J D, Powell D H, Venkateswaran K. 2004. MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores. Journal of Microbiological Methods,58(1): 1-12.

Dijksterhuis J, Sanders M, Goms LG J, Smid E. 1999. Antibiosis play a role in the context of direct interaction during an tagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxyspomm*. Journal of Applied Microbiology, 86: 13-21.

Ding F, Jin S X, Hong N, Zhong Y, Cao Q, Yi G, Wang G P. 2008. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips. Plant Cell Reports, 27(2): 241-250.

Dowing K J, Thomson J A. 2000. Introduction of the *Serratia marcescens chiA* gene into an entophytic *pseudomonas fluorescens* for the biocontrolof phytopathgenic fungi. Can J Microbiol, 46(4): 363-369.

Driss F, Rouis S, Azzouz H, Slim T, Nabil Z, Samir J. 2011. Integration of a Recombinant Chitinase into *Bacillus thuringiensis* Parasporal Insecticidal Crystal. Curr Microbiol, 62(1): 281-288.

Dula B, Aponyi-Garamvolgy I, Vajna L. 1987. Biological control of *Fusarium wilt* of watermelon by means of the antagonistic fungus Trichoderma. Növényvédelem, 23(6): 249-251.

Eberl L, Ammendola A, Geisenberger O, Robert E, Claus S. 1997. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. FEMS Microbiology Letters, 149(1): 77-83.

Eckert J W, Ogawa J M. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits, Annual Review of Phytopathology, 23: 421-454.

Eduardo A M, Harry B, Anu K, Eric S, Hugues D, Sylvie A, Sylvain Cottaz. 2012. Engineering chitinase for the synthesis of chitin oligosaccharides: catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74: 89-96.

Edwards S G, Seddon B. 1992. *Brevibacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected chinese cabbage. Recent advances in botrytis research. Netherlands: Pudoc Scientific Publications, 267-271.

Edwards S G, Seddon B. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea in vitro*. Journal of Applied Microbiology, 91(4): 652-659.

Edwards S G. 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Brevibacillus brevis* on protected chinese cabbage. UK Aberdeen: Aberdeen University.

El-Abyad M S, El-sayed M A, El-shanshour A R, El-Sabbageh S M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of Lycopersicon esculentum Mill using antagonistic streptomyces spp. Plant and Soil, 149(2): 185-195.

Elizabeth A B E, Handelswan J O. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram) positive perspective. FEMS Microbiol Letters, 171(1): 1-9.

Ellerbrok H, Nattermann H, Muhsin O, Lothar B, Bernd A, Georg P. 2002. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. Fems Microbiology Letters, 214: 51-59.

Elvira R M, Vuurde J W L. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. Can J Microbiol, 46(11): 1036-1041.

Erickson L, Hubbard N E, Roberts S B, Heyman M B, Shrago E, Woldegiorgis G, Merrill A H J, Preusch P C, Sandstead H H, Lofgren P A, Krumdieck C L, Dirienzo D B, Schanler R J, Duffy L C, Kurz K, Galloway

R, Singletary K, Klevay L M. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. Journal of Nutrition, 130(2S Suppl): 403-409.

Fatma D, Souad R, Hichem A, Slim T, Nabil Z, Samir J. 2011. Integration of a recombinant chitinase into *B. thuringiensis* parasporal insecticidal crystal. Curr Microbiol, 62: 281-288.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.

Feng G E. 2002. Modern Ecology. Beijing: Science Press: 252-254.

Fernando E V, Monica P, Francisco P, Jeffrey S B. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. Basic Microbiol, 45(5): 371-380.

Fisher P J, Pertini O, Scott H M L. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize. New Phytologist, 122(2): 299-305.

Fox G E, Wisotzkey J D, Jurtshuk P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Journal of Systematic Bacteriology, 42: 166-170.

Frostegård A, Bååth E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biol Fertil Soils, 22: 59-65.

Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. Soil Biology & Biochemistry, 25(6): 723-730.

Fry N K W S, Saunders N A, Embley T M. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. Journal of General Microbiology, 137: 1215-1222.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animal. Journal of Applied Bacteriology, 66(5): 365-378.

Gainvors A, Nedjaoum N, Gognie, Muzart M, Nedjma M, Belarbi A. 2000. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 183: 131-135.

Garbeva P, Van Overbeek L S, van Vuurde, Elsas J D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. Microbial Ecology, 41(4): 369-383.

Gartner A, Blumel M, Wiese J, Imhoff J F. 2011. Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. Antonie Van Leeuwenhoek, 100(3): 421-435.

Gary A, Strobel W, Hess M. 1997. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic funfus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. Chemistry and Biology, 4(7): 529-536.

Gatson J W, Benz B F, Chandrasekaran C, Satomi M, Venkateswaran K, Hart M. 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1475-1484.

Gerhard M, Renate W, Mohamed A M. 1989. Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetases 1 and 2 from *Bacillus brevis*: evidence for an operon. Journal of Bacteriology, 4881-4887.

Ghasemi S, Ahmadian G, Sadeghi M, Zeigler D R, Rahimian H, Ghandili S, Naghibzadeh N, Dehestani A, Ahmadian G. 2011. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. Enzyme and Microbial Technology, 48: 225-231.

Gleason H A. 1922. On the relation between species and area.Ecology, 3(2): 158-162.

Gond S K, Verma V C, Kumar A, Kumar V, Kharwar R N. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10(23): 1371-1375.

Gong C M, Inoue K, Inanaga S, Someya T. 2005. Survival of pathogenic bacteria in compost with special reference to *Escherichia coli*. Journal of Environmental Sciences, 17(5): 770-774.

Gopalakrishnan T R, Peter K V. 1991. Screening and selection for bacterial wilt resistance in chilli. Indian

Journal of Genetics and Plant Breeding, 51(3): 332-334.

Gordon R E, Haynes W C, Pang H N. 1973. The Genus Bacillus. New York: Agricultural Research Service: 107-108.

Graham M H, Haynes R J, Zelles L, Meyer J H. 2001. Long-term effects of green cane harvesting versus burning on the size and diversity of the soil microbial community. Proc S Afr Sug Technol Ass, 75: 228-234.

Guérout-Fleury A M, Shazand K, Frandsen N, Stragier P. 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. Gene, 167(1-2): 335-336.

Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathology, 92(9): 976-985.

Gunawan S, Tufts D M, Bextine B R. 2008. Molecular identification of hemolymph-associated symbiotic bacteria in red imported fire ant larvae. Current Microbiology,57(6): 575-579.

Haeckel E. 1866. Generelle Morphologie der Organismen. Berlin: Nabu Press:

Hallmann J, Hallmann A Q, Miller W G, Sikora R A, Lindow S E. 2001. Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent rhizobium etli G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. Phytopathology, 91(4): 415-422.

Han Y, Yang B, Zhang F, Miao X L, Li Z Y. 2009. Characterization of antifungal chitinase from *Marine Streptomyces sp*. DA11 associated with south China sea sponge *Craniella Austreliensis*. Marine Biotechnology, 11(1): 132-140.

Hasunuma T, Fukusaki E I, Kobayashi A. 2003. Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. J Biotechnol, 106: 45-52.

Hayi A. 沈天翔. 1989. 发酵过程中枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶重组质粒的稳定性. 应用微生物, (1): 49-51.

Hayward A C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. *In*: Hayward A C, Hartman G L. Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent *Pseudomonas solanacearum*. Oxford, U K: CAB Int.

Hee Y P, Aron P, Seong E J. 2012. Functional expression and structural characterization of ORF cDNA encoding chitinase of the beet armyworm, *Spodotera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, 15: 45-50.

Henning D M, Mohamed A M. 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. Journal of Bacteriology, 6843-6850.

Hidehiko Y, Takahiro A, Akio T, Takao M, Sasaki T, Tsukagoshi N, Udaka S. 1987. Cloning and characterization of the 5' region of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47. Journal of Bacteriology, 1239-1245.

Hidehiko Y, Norihiro T, Shigezo U. 1981. Morphological alterations of cell wall concomitant with protein release in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. Journal of Bacteriology, 322-332.

Hinton D M, Bacon C W. 1995. Enterobacter cloacae is an endophytic symbiont of corn. Mycopathologia, 129: 117-125.

Hiroko T, Motoko Y, Makoto M, Hiroaki T, Masao T et al. 1998. Molecular cloning of the dnaK locus, and purification and characterization of a DnaK protein from *Bacillus brevis* HPD31. Biochimica et Biophysica Acta, 1387: 65-79.

Hironobu M, Hisao M. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ, 2(23): 109-117.

Hiroya Y, Reiko H, Hisashi Y, Ryoji M, Sakai Y, Nobuo K. 2002. The ribulose monophosphate pathway operon encoding formaldehyde fixation in a thermotolerant methylotroph, *Bacillus brevis* S1. FEMS Microbiology Letters, 214: 189-193.

Hoang H L, Dominik D, Schmidt I T, Baldwin. 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. PLoS

One, 3(7): 1-10.

Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, Kaminogawa S.1999.Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (natto) spores are dependent upon dietary components. Can J Microbiol, 45: 59-66.

Hu G P, You M S, Liu B, Zhu Y Q, Zheng X F, Lin Y Z. 2010. Relationship between the stem endophytic and rhizosphere bacteria and the variety characteristics of *Oryza sativa*. Chinese Journal of Tropical Crops, (006): 1026-1030.

Hu S B, Liu P, Ding X Z, Yan L, Sun Y J, Zhang Y M. 2009. Efficient constitutive expression of chitinase in the mother cell of *Bacillus thuringiensis* and its potential to enhance the toxicity of Cry1Ac protein. Appl Microbiol Biotechnol, 82: 1157-1167.

Hua N P, Kobayashi F, Yasunobu I, Shi G Y, Naganuma T. 2007. Detailed identification of desert-originated bacteria carried by Asian dust storms to Japan. Aerobiologia, 23: 291-298.

Huang L X, Garbulewska E, Sato K, Kato Y, Nogawa M, Taguchi G, Shimosaka M, Shimosaka M. 2012. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a faminly 19 chitinase. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(3): 293-299.

Huang Y, Locy R, Weee J D. 2004. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Geotrichum marinum*. Lipids, 39(3): 251-257.

Huckelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. Plant Physiology, 119(4): 1251-1260.

Hurek T, Handley L L, Reinholdhurek B, Piché Y. 2002. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 15(3): 233-242.

Inooka S, Uehara S, Kimura M. 1986.The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. Poultry Science, 65(65): 1217-1219.

Iqbal M, Wright DI. 1997. Evaluation of resistance, cross resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidate). Bulletin of Entomological Research, 87: 481-483.

Ishihara T, Tomita H, Hasegawa Y, Tsukagoshi N, Yamagata H, Udaka S. 1995. Cloning and characterization of the gene for a protein thiol-disulfide oxidoreductase in *Bacillus brevis*. Journal of Bacteriology, 177(3): 745-749.

Iwao S. 1971. An approach to the analysis of aggregation patern in biological populations. Statist. Ecol., 1: 461-513.

Iwao S. 1976. Relation of frequency index to population density and distribution patern. Physiol. Ecol., 17: 457-464.

Iwo S. 1968. A new regression method for analysis the aggregation pattern of animal population. Res. Pop. Ecol, 10: 1-20.

Jankiewicz U, Brzezinska M S, Saks E. 2012. Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia* , a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(1): 30-35.

Janpen P, Kiwamu M, Kamonluck T, Boonkerd N, Teaumroong N. 2009. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Applied Soil Ecology, 42(2): 141-149.

Jason N B, Michael J L, Robert M S, Jones S A, Ben H, Mark R H . 2012. Structural analysis of Chi1 chitinase from Yen-Tc: the multisubunit insecticidal ABC toxin complex of *Yersinia entomophaga*. Journal of Molecular Biology, 415: 359-371.

JetiyAnon K, Kloepper J W, Kanchalee J. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for

induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control, 24(3): 285-291.

Jin L Z, Ho Y W, Abdullah N, Jalaudin S. 1996. Influence of dried *Bacillus substillis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 9(4): 397-404.

Joergensen R G, Potthoff M. 2005. Microbial reaction in activity, biomass and community structure after long-term continuous mixing of a grassland soil. Soil Biol Biochem, 37: 1249-1258.

Johnson W C, Moran C P, Losick R. 1983. Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between over-lapping promoters for a developmentally regulated gene. Nature, 302: 800-804.

Jong Y R, Yang S K, Yong W, Liu Q, Tao X Y, Xu H G, Shim H J. 2010. Expression of *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin in an antimicrobial *Bacillus brevis* strain. Journal of Asia-Pacific Entomology, 13: 61ur4.

Jukes T H, Cantor C R. 1969. Evolution of protein molecules. *In*: Munro H N. Mammalian Protein Metabolism. New York: Academic Press: 21-132.

Kapoor M, Beg Q K, Bhushan B. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkalistable polygalacturonasefrom *Bacillus* sp. MG-cp-2. Process Biochem, 36: 467.

Karrer P, Hofmann A. 1929. Über den enzymatischen Abbau von Chitin und Chitosan I. Helv. chim.Acta., 12: 616-637

Kerovuo J, Lappalainen I, Reinikainen T. 2000. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 268: 365-369.

Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Environ. Microbiol., 64: 2079-2085.

Khalil A I, Beheary M S, Salem E M. 2001. Monitoring of microbial population and their cellulolytic activities during the composting of municipal solid waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 155-161.

Ki J S, Zhang W, Qian P Y. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. Journal of Microbiological Methods, 77(1): 48-57.

Kim O S, Cho Y J, Lee K, Yoon S H, Kim M, Na H, Park S C, Jeon Y S, Lee J H, Yi H, Won S, Chun J. 2012. Introducing Eztaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol, 62: 716-721.

Kim Y H, Kim I S, Moon E Y, Park J S, Kim S J, Lim J H, Park B T, Lee E J. 2011. High abundance and role of antifungal bacteria in compost-treated soils in a wildfire area. Microbial Ecology, 62: 725-737.

Kim Y O, Lee J K, Kim H K, Yu J H, Oh T K, Lee J K. 1998. Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 162: 185-191.

Kimura M, Asakawa S. 2006. Comparison of community structures of microbiota at main habitats in rice field ecosystems based on phospholipid fatty acid analysis. Bio Fertil Soils, 43: 20-29.

Kittelbergerl R, Pavela-Vrancic M, Von D H. 1999. Active site titration of gramicidin S synthetase 2: evidence for misaction and editing in non-ribosomal peptide biosynthesis. FEBS Letters, 461(3): 145-148.

Kiwamu M, Kiyo N, Taro M, Ye B, Miyamoto T, You M, Saito A, Saito M, Barraquio W L, Teaumroong N, Sein T. 2004. Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of clostridia isolated from gramineous plants. Appl Envir Microbio, 70(5): 3096-3102.

Kleopper J W, Schipper B, Bakker P A H M. 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. Phytopathology, 82: 726-727.

Ko K S, Kim J M, Kim J W, Jung B Y, Kim W Y, Kim I J, Kook Y H. 2003. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology,41(7):

2908-2914.

Ko K S, Oh W S, Lee M Y, Lee J H, Lee H, Peck K R, Lee N Y, Song J H. 2006. *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(Pt 11): 2541-2544.

Kobayashi D Y, Palumbo J D. 2000. Bacterial endophytes and their on plant and uses in agriculture. Microbial Endophytes. New: Marcel Dekker: 199.

Köberl M, Müller H, Ramadan E M., Berg G. 2011. Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. PLoS One, 6: 244-252.

Koji M, Takafumi S, Fengqiu L, Frank S, Thuenemann E, George L. 2012. Identification of an E-box motif responsible for the expression of jasmonic acid-induced chitinase gene OsChia4a in rice. Journal of Plant Physiology, 169: 621-627.

Kostarelos K, Tadros T F, Luckham P F. 1998. Physical conjugation of (tri-) block copolymers to liposomes toward the construction of sterically stabilized vesicle systems. Langmuir, 15(2): 369-376.

Kristensen B K, Bloch H, Rasmussen S K. 1999. Barley coleoptile peroxidases, purification, molecular cloning, and induction by pathogens. Plant Physiology, 120(2): 501-512.

Kuc J, Richmond S. 1977. Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichun lagebarium* by *Colletotrichun lagebarium*. Phytopathology, 67: 533-536.

Kuno E. 1968. Studies on the population dynamics of rice leafhoppers in a paddy field. Bull. Kyushu Agric. Exp. Stn., 14: 131-246.

Kyriakis S C, Tsiloyiannis V K, Vlemmas J, Sarris K, Tsinas A C, Alexopoulos C, Jansegers L. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. Research in Veterinary Science, 67(3): 223-228.

Kyungseok P, Diby P, Yong K K, Nam K W, Lee Y K, Choi H W, Lee S Y. 2007. Induced systemic resistance by bacillus vallismortis EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathol J, 23(1): 22-25.

Lacava P T, Araujo W L, Marcon J, Maccheroni W, Azevedo J L. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa* causal agent of citrus variegated chlorosis. Letters in Applied Microbiology, 39(1): 55-59.

Lacava P T, Li W, Araujo W L, Azevedo J L, Hsrtung J S. 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in catharanthus roseus. Journal of Microbiology, 45(5): 388-393.

Landeweert R, Leeflang P, Kuyper T W, Hoffland E, Rosling A, Wernars K, Smit E. 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied & Environmental Microbiology, 69(1): 327-333.

Lang C, Domenburg H. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of poly- galacturonases. Appl Microbiol Biotechnol, 53: 366-375.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg S L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biology, 10(3): 1-10.

Larran S, Rollán C, Ângeles H B, Alippi H E, Urrutia M I. 2002. Nota Corta: Endophytic fungi in healthy soybean leaves. Invest. Agr.: Prod. Prot, 17(1): 1-6.

Laslett D, Canback B. 2004. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. Nucleic Acids Res, 32: 11-16.

Lavrieat M R. 1998. Forest floor microbial biomass across a northern hardware successional sequence. Soil Biol Biochem, 31: 431-439.

Lee I Y, Seo W T, Kim G J. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. Bioprocess Engineering, 16(2): 71-75.

Lee K D, Bai Y, Smith D. 2005. Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from bean nodules. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1(3): 232-236.

Lee S, Ka J O, Song H G. 2012. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhattai* in microcosm soil. The Journal of Microbiology, 50(1): 45-49.

Lee Y J, Kim B K, Lee B H, Jo K I, Lee N K. 2008. Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technology, 99(2): 378-386.

Leejeerajumnean A, Ames J M, Owens J D. 2000. Effect of ammonia on the growth of Bacillus, species and some other bacteria. Letters in Applied Microbiology, 30(5): 385-389.

Leff L G, Leff A A. 1996. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. Appl Environ Microbiol., 62(9): 3486-3488.

Lereclus D, Delecluse, Lecadet M M. 1993. Diversity of *B. thuringiensis* toxin and genes. *In*: Entwistle P F, Cory J S, Bailey M J, Hoggs S. *B. thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. London: John Wiley & Sons Ltd Press:37-70.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G. Durbin R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics, 25: 2078-2079.

Li J G, Shun X G. 2009. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. African Journal of Biotechnology, 8(5): 731-736.

Lim H, Choi H T. 2010. Growth inhibition of the yeast transformant by the expression of a Chitinase from *Coprinellus congregatus*. The Journal of Microbiology, 48(5): 706-708.

Ling H S, Lingtau C, Mohamad R, Ariff A B. 2009. Characterization of pullulanase type ii from *Bacillus cereus* H1.5. American Journal of Biochemistry and Biotechnology,5(4): 170-179.

Liu B, Sengonca C. 2002. Investigations on side-effects of the mixed biocide BtA on different predators of *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae) in southeast China. Pest Science, 75: 57-61.

Liu B, Sengonca C. 2003a. Conjugation of δ - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* with abamectin of *Streptomyces avermitilis* as a new type of biocide BtA in control of agricultural insect pests. Pest Science, 76(2): 44-49.

Liu B, Sengonca C. 2003b. Comparison of spatial niche breadth and overlap between predators and their preys, as pests in a cabbage field under the treatments of GCSC-BtA biocide and methomyl insecticide. Fujian Agri Sci, 18(2): 78-86.

Liu H, Zhou Y, Liu R,Zhang K Y, Lai R. 2009. *Bacillus solisalsi* sp. Nov.,a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. Int J Syst Evol Microbiol, 59(6): 1460-1464.

Liu L, Kloepper J W, Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium wilt* by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85(6): 695-698.

Lloyd M. 1967. Mean crowding. J Anim Ecol, 36: 1-3.

Logan N A, De Vos P. 2009. Genus I. *Bacillus*. *In*: De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N R, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K H, Whitman W B. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer, 3: 21-128.

Losick R, Pero J. 1981. Cascades of sigma factors. Cell, 25: 582-584.

Lundstrom J, Krause G, Holmgren A. 1992. A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. The Journal of Biology Chemistry, 267(13): 9047-9052.

Luttrell R E, Rannick G A, Soto-Hernandez J L, Verghese A. 1988. *Kluyvera* species soft tissue infection: case report and review.Journal of Clinical Microbiology, 26(12): 2650-2651.

Lv XC, Huang Z Q, Zhang W, Rao PF, Ni L. 2012. Microbial diversity of traditional fermentation starters for Hong Qu Glutinous Rice Wine As Determined By PCR-Mediated DGGE. Food Control, 28(2): 426-434.

Madigan M T, Martinko M, Parker J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. USA: Prentice Hall Inc: 662-750.

Magurran A E. 1988. Ecological diversity and its measurement. USA: Princeton University Press.

Mano H F, Tananka A, Watanabe H, Kaga H, Okunishi S, Morisaki H. 2006. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice palnts (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. Microbes Environ, 221: 86-100.

Manzano M, Cocolin L, Cantoin C, Comi G. 2003. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. International Journal of Food Microbiology, 81(3): 249-254.

Marciano R R, Rute T S, Alan W V P, Cristina S M, Welington L A. Deise R S, João L A. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of Crinipellis perniciosa, causal agent of Witches' Broom Disease. Int J Biol Sci, 1: 24-33.

Marina R, Marina Rro, Marietjie S, Hoppe H C. 2007. Inhibition of malaria parasite blood stages by tyrocidines, membrane-active cyclic peptide antibiotics from *Bacillus brevis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1768: 1488-1497.

Marquardt R R, Brenes A, Zhang Z, Boros D. 1996. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. Animal Feed Science & Technology, 60(s 3–4): 321-330.

Martinez E A, Boer H, Koivula A,Samain E, Driguez H, Armand S, Cottaz S. 2012. Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 faminly glycoside hydrolases into transglycosylases: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74: 89-96.

Maruta K, Miyazaki H, Tadano Y, Masuda S, Suzuki A, Takahashi H, Takahashi M. 1996. Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 intake on fecal flora of sows and on diarrhea and mortality rate of their piglets. Nihon Chikusan Gakkaiho, 67(5): 403-409.

Masahiro Na, Kei M, Jun S. 1996. Production and purification of Clostridium perfringens alpha-toxin using a protein-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47. FEMS Microbiology Letters, 145: 239-243.

Matrina K, Henry M, Ramadan EM, Berg G. 2011. Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. PLoS One, 6(9): 244-252.

Mcdaniels A E, Rice A L. 1996. Confirmational identification of *Escherichia coli*. a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β-D-glucuronidase. Applied and Environmental Microbiology, 62: 3350-3354.

Mcinroy J A, Kloepper J W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant and Soil, 173(2): 337-342.

Meenu K, Singh G, Vishwakarma R A. 2014. Chapter 22–Molecular mechanism of cellulase production systems in trichoderma.Biotechnology & Biology of Trichoderma, 319-324.

Meintanis C, Chalkou K I, Kormas K A, Lymperopoulou D S, Katsifas E A, Hatzinikolaou D G, Karagouni A D. 2008. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillu*s. Letters in Applied Microbiology, 46(3): 395-401.

MIDI, Inc. 2002. Sherlock Microbial Identification System, Version 4.5, MIS Operating Mannual.

Miyamot K, Shimizu T, Lin F Q, Sainsbury F, Thuenemann E, Lomonossoff G, Nojiri H, Yamane H, Okada K. 2012. Identification of an E-box motif responsible for the expression of jasmonic acid-induced chitinase gene *OsChia4a* in rice. Journal of Plant Physiology, 169: 621-627.

Mocali S, Bertelli E, Di Cello F, Mengoni A, Sfalanga A, Viliani F. 2003. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. Microbiol, 154(2): 105-114.

Mohamed A M, Peter Z, Gregor C, Losick R. 1987. Identification of the promoter for a peptide antibiotic biosynthesis gene from *Bacillus brevis* and its regulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology: 2215-2222.

Monika G, Gomes N C M, Albert D, Rodrigo C, Gabriele B, Raquel P. 2006. Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial

community. FEMS Microbiol Ecol, (56): 207-208.

Mota F F D, Gomes E A, Paiva E, Rosado A S, Seldin L. 2004. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. Letters in Applied Microbiology, 39(1): 34-40.

Müller K, Schmid E N, Kroppenstedt R M. 1998. Improved identification of mycobacteria by using the microbial identification system in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. Journal of Clinical Microbiology, 36(9): 2477-2480.

Nakamura L K, Roberts M S, Cohan F M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. subtilis subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 1211-1215.

Nakamura L K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 39: 295-300.

Narasimha K K, Zhou P. 2012. Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. Carbohydrate Research, 374: 155-160.

Neuensehwander U, Lawton K, Ryals J. 1996. Systemic acquired resistance. *In*: Stacey G, Keen N. Plant Microbe Interactions. New York: Chapman& Hall.

Nicholson W I, Maughan H. 2002. The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 184: 4936-4940.

Noctor G, Foyer C H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 49: 249-279.

Nonomura T, Tajima H, Kitagawa Y, Sekiya N, Shitomi K, Tanaka M, Maeda K, Matsuda Y, Hideyoshi T. 2003. Distinguishable staining with neutral red for GFP-marked and GFP-nonmarker *Fusarium oxysporum* strains simultaneously colonizing root surfaces. Journal General Plant Pathology, 69: 45-48.

Norin E, Midtvedt T, Björksén B. 2004. Development of faecal short-chain fatty acid pattern during the first year of life in Estonian and Swedish infants. Microbial Ecol Heal Dis, 16: 8-12.

Normander B, Niels B H, Nybroe O. 1999. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability and activity in the natural barley rhizosphere. Appl Envir Microbiol., 65(10): 4646-4651.

Obag W J, Korste N L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *B. subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biology and Technology, 28(1): 187-194.

Odum E P. 1971. Fundamentals of Ecology. Philadelphia: Saunders. USA

Oh E T, So J S, Kim B H, Kim J S, Koh S C. 2004. Green fluorescent protein as a marker for monitoring a pentachlorophenol degrader *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC39723. The Journal of Microbiology, 42 (3): 243-247.

Ohansen A, Olsson S. 2005. Using phospholipid fatty acid technique to study short term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere. Microb Ecol, 49: 272-281.

Okon Y, Itzigsohn R. 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. Biotechnol Adv, 13(3): 415-424.

Orgambide G, Montrozier H, Servin P, Roussel J, Demery D T, Trigalet A. 1991. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. J Bio Chem, 266, 8312-8321.

Ozaktan H, Bora T. 2000. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *meloni*s by the formulations of fluorescent pseudomonads. Journal of Turkish Phytopathology, 29(2-3): 133-149.

Ozbek A, Aktas O. 2003. Identification of three strains of Mycobacterium species isolated from clinical

samples using fatty acid methyl ester profiling. Journal of International Medical Research, 31(2): 133-140.

Pandey A, Benjamin S, Soccol C R, Niqam P, Krieqer N, Soccol V T. 1999. The realm of microbiallipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem, 29: 119-131.

Parenicova L, Benen J A, Kester H C. 2000. *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalactumnases of *Aspergillus niger*. Biochem J, 345: 637.

Park H Y, Paek A, Jeong S E. 2012. Functional expression and structural characterization ORF cDNA encoding chitinase of the beet armyworm, *Spodotera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, 15: 45-50.

Pasteur L. 1876. Études sur la bière, ses maladies, causes qui les provoquent, procédé pour la render inalterable. Paris: Gauthier-Villars, 54-57.

Pecetti L, Romani M, Carroni A M. 2008. The effect of endophyte infection on persistence of tall fescue (*Festucaarundinacea* Schreb.) populations in two climatically contrasting Italian locations. Australian Journal of Agricultural Research, 58(9): 893-899.

Pérez S, Mazeau K, Penhoat C H D. 2000. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. Plant Physiology & Biochemistry,38(1): 37-55.

Pérez S, Rodriguez-Carvajal M A, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan IL A structure in quest of a function. Biochimle, 85: 109-121.

Peters S, Draeger S, Aust H J, Schulz B. 1998. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. Mycologia, 90: 360-367.

Peters T, Davidson L K. 1982. The biosynthesis of rat serum albumin; *in vivo* studies on the formation of the disulfide bonds. Biology Chemical, 257: 8847-8853.

Pianka E R. 1973. The structure of lizard communities (citation classic).Annual Review of Ecology & Systematics, 4: 53-74.

Piaohc H Y. 2000. Seasonal changes of microbial biomass carbon related to factors in soils from karst areas of southwest China. Biol Fert Soils, 30(4): 294-297.

Pielou E C. 1975. Mathematical Ecology. New York: John Wiley and Sons Inc Press.

Popoff M Y, Bockemuhl J, Gheesling L L. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology, 155(7): 568-570.

Posada F, Vega F E. 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (Theobromacacao). Mycologia, 97: 1195-1200.

Powar V K, Jagannathan V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 151: 1102-1108.

Prade R A, Zohan D, Ayoubi P, Mort A J. 1999. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. Biotechnol Genetic Eng Rev, 16: 361-391.

Prescott L M, Harket J P, Klein D A. 2000. Microbiology. New York: McCraw-Hill Higher Education Press.

Qi Y, Patra G, Liang X, Williams L E, Rose S, Redkar R J. 2001. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Applied Environmental Microbiology, 67: 3720-3727.

Quadt-Hallmann A, Benhamou N, Kloepper J W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. Canadian Journal of Microbiology, 43(6): 577-582.

Quinlan A R, Hall I M. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics, 26: 841-842.

Rainey F A, Ward-Rainey N, Kroppenstedt R M. 1996. The genus nocardiopsis represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of nocardiopsaceae fam. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 46(4): 1088.

Ramette A, Moënne-Loccoz Y, Défago G. 2003. Prevalence of *fluorescent pseudomonads* producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. FEMs Microbiology Ecology, 44(1): 35-43.

Ramos H J, Roncato-Maccari L D B, Souza E M, Hungria M. 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interaction using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. Biotechnol, 97(3): 243-252.

Rasche F, Lueders T, Schloter M, Schaefer S, Buegger F, Gattinger A, Hood-Nowotny R, Sessitsch A. 2009. DNA-stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potato. New Phytologist, 181(4): 802-807.

Ravel F, Courty C, Coret A, Charmet G. 1997. Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress. Agronomie, 17: 173 - 181.

Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M. Kersters K, De Ley J. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. Intern J Syst Bacteriol, 43(3): 574-584

Reva O N, Smirnov V V, Pettersson B, Priest F G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants *Gossypium* sp. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 101-107.

Riley M S, Cooper V S, Lenski R E, Larry J. 2001. Rapid phenotypic change and diversification of a soil bacterium during 1000 generations of experimental evolution. Microbiology, 147(4): 995-1006.

Roberts M S, Nakamura L K, Cohan F M. 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. International Journal of Systematic Bacteriology, 46: 470-475.

Roberts M S, Nakamura L K, Cohan F M. 1994. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and difference in fatty acid composition. International Journal of Systematic Bacteriology, 44: 256-264.

Rodrigo M, Aline A, Pizzirani K, Araujo W L, Raaijmakers J M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of burkholderia cepacia complex isolates. Applied and Environmental Microbiology, 22(73): 7259-7267.

Rong L Y, Foo L Y. 2000. Antioxdiant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry, 68(1): 81-85.

Rong L Y, Foo L Y. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry, 68(1): 81-85.

Rooney A P, Price N P J, Ehrhardt C, Bannan J D, Rooney AP. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 2429-2436.

Rosenblueth M, Martinez R E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. Arch. Microbiol., 181: 337-344.

Saile E, McGarvey J A, Schell M A. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology, 87: 1264-1271.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.

Salamancaef R J. 2006. Microbia reaction of secondary tropical forest soils to the addition of leaf litter. Appl Soil Ecol, 31: 53-61.

Sanguin H, Remenant B, Dechesne A, Thioulouse J, Thioulouse J, Vogel T M, Nesme X, Moenne-Loccoz Y,

Grundmann G. 2006. Potential of a 16s rrna-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. Applied & Environmental Microbiology, 72(6): 4302-4312.

Santoso U, Tanaka K, Ohtani, Ohtani S. 1995. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. British Journal of Nutrition, 74(4): 523-529.

Sarvas M. 1995. Gene expression in recombinant *Bacillus*. Bioprocess Technol., 22: 53-120.

Satoshi K, Yoko Y, Masanori I, Masaki N, Taniguchi T, Matano K,Moriyama A, Ohkuma K, Goto N, Udaka S, Tochikubo K. 2000. Efficient extracellular production of recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit by using the expression/secretion system of *Bacillus brevis* and its mucosal immunoadjuvanticity. Vaccine, 18: 1730-1737.

Schell M A, Denny T P, Huang J. 1994. VsrA, A second two-component sensor regulationg virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. Mol Microbiol, 11, 489-500.

Schmidt M, Bornscheuer U T. 2005. High-throughput assays for lipases and esterases. Biomolecular Engineering, 22(s1-3): 51-56.

Schnepf E, Crickmore N, Rie J V, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D R, Dean D H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology & Molecular Biology Reviews,62(3): 775-806.

Schnepf H E, Whiteley H R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, (78): 2893-2897.

Sengonca C, Liu B, Zhu Y J. 2001. Efficiency of the biocide BtA against vegetable pests of different arthropod orders in the south-eastern China. Pest Science, 74(2): 33-36.

Sengonca C, Liu B. 2001a. Influence of mixed biocide GCSC-BtA on the pupa and the adult stages of *Apanteles plutella* Kurd (Hym. Braconidae) and its host, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Plutellidae). Journal of Pest Science, 74: 145-149.

Sengonca C, Liu B. 2001b. Influence of biocide BtA on the pupa and adult stages of *Apanteles plutellae* Kurd(Hym., Braconidae) and its host, *Plutella xylostella*(L.) (Lep., Plutellidae). Pest Science, 74: 1-5.

Sengonca C, Liu B. 2002. Effect of GCSC-BtA biocide on population dynamics of cabbage pests and their natural enemies from fields in the southeastern China. Journal of Pest Science, 75(2): 46-50.

Sessitsch A, Reiter B, Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant- growth-promoting and antagonistic abilities. Can J Microbiol, 50(4): 239-249.

Seyedhadi G, Gholamreza A, Mehdi S, Zeigler D R, Rahimian H, Ghandili S. 2011. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. Enzyme and Microbial Technology, 48: 225-231.

Shan Y. 2008. Present situation development trend and countermeasures of citrus industry in China. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 8(001): 1-8.

Shazer W H, Speckman R A. 1984. Continuous fermentation of whey permeate by Bacillus polymyxa. J Dairy Sci, 67: 1216-1218.

Shelton A M, Naranjo S E, Romeis J, Hellmich R L, Wolt J D, Federici B A, Albajes R, Bigler F, Burgess E P J, Dively G P, Gatehous A M R, Malone L A, Roush R, Sears M, Sehnal F. 2009. Setting the record straight: a rebuttal to an erroneous analysis on transgenic insecticidal crops and natural enemies.Transgenic Research, 18(3): 317-322.

Shi R, Yin M, Tang S K, Lee J C, Park D J, Zhang Y J, Kim C J, Li W J. 2011. *Bacillus luteolus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(6): 1344-1349.

Shi Y W, Lou K, Li C. 2009. Isolation ,quantity distribution and characterization of endophytic

microorganisms within sugar beet. African Journal of Biotechnology, 8(5): 835-840.

Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus brevis* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 939-946.

Shimizu M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56: 1266-1269.

Shivaji S, Chaturvedi P, Begum Z, Pindi PK, Manorama R, Padmanaban DA, Shouche YS, Pawar S, Vaishampayan P, Dutt CB, Datta GN, Manchanda RK, Rao UR, Bhargava PM, Narlikar JV. 2009. *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhattai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 59(12): 2977-2986.

Shivaji S, Chaturvedi P, Suresh K, Reddy GS, Dutt CB, Wainwright M, Narlikar JV, Bhargava PM. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(Pt 7): 1465-1473.

Siciliano S D, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte L G, Banks M K, Schwab P, Lee K, Greer C W. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. Applied and Environmental Microbiol, 67: 2469-2475.

Siciliano S D, Germida J J. 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B*. *napus* cv. Excel and *B*. *rapa* cv. Parkland. FEMS Microbiology Ecology, 29(3): 263-272.

Siemering K R, Golbik R, Sever R, Haseloff J. 1996. Mutations that suppress the thermo sensitivity of green fluorescent protein. Curr. Biol., 6: 1653-1663.

Simonen M, Palva I. 1993. Protein secretion in Bacillus species. Microbiological Reviews, 57(1): 109-137.

Simpson L B. 1949. A letter concerning cook and simpson, the population of central mexico in the sixteenth century. Hispanic American Historical Review, 29(3): 445-447.

Siva S, Gwyn A. B. 2003. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* b728a and pantoea agglomerans brt98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. Applied and Environmental Microbiology, 69(2): 1220-1228.

Skillman L C, Sutherland L W, Jones M V, Goulsbra A. 1998. Green fluorescent protein as novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms. Microbiology, 144(8): 2095-2101.

Sögaard H, Suhr-Jessen T. 1990. Microbials for feed: beyond lactic acid bacteria. Feed International, 4: 33-37.

Sophie T, Hu X M, Jacques M. 2011. Characterization of *Bacilli* isolated from the confined environments of the Antarctic Concordia station and the international space station. Astrobiology, 11(4): 323-334.

Soufiane B, Côté J C. 2009. Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. Antonievan Leeuwenhoek, 95: 33-45.

Steger K, Jarvis A, Smårs, Sundh I. 2003. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. Journal of Microbiological Methods, 55(2): 371-382.

Steven D S, Nathalie F, Anca M. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. Applied and Environmental Microbiology, 67(6): 2469-2475.

Steven J D, Mark R H. Hurst T R G, Callaghan M O, Ronson C W. 2006. Occurrence of sep insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*. Applied and Environmental Microbiology, 72(10): 6584-6592.

Strobel G A, Miller R V, Miller C, Condron M M, Teplow D B, Hess W M. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. Microbiology, 145: 1919-1926.

Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. J Nat Prod, 67: 257-268.

Sturz A V, Christie B R, Nowak J. 2000. Baterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. Critical Reviews in Plant Sciences, 19(1): 1-30.

Sturz A V. 1996. Populations of endophytic bacteria which influence host resistance to *Erwin- iainduced* bacterial soft rot in potato rub bers. Plant Soil, 184: 265.

Sturz A V. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliages and their influence on host growth. Biology Fertility Soils, 25: 13.

Subandiyah S, Nikoh N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumu S, Fukatsu T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *diaphorina citri* (homoptera, psylloidea) in Indonesia. Mycoscience, 41(5): 509-513.

Sukada M, Manamohan M, Rawalr D. 2004. Interaction of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with Pseudomonas fluorescens precolonized to banana roots. World Journal of Microbiology＆Biotechnology, 20: 651-655.

Svercel M, Christen D, Moënne-Loccoz Y, Duffy B, Défago G. 2009. Effect of long-term vineyard monoculture on rhizosphere populations of pseudomonads carrying the antimicrobial biosynthetic genes *phld* and/or *hcnab*. FEMS Microbiology Ecology, 68(1): 25-36.

Tabbene O, Ben S, Bouabdallah F, Mangoni M L, Urdaci M C. 2009. Production of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus* activity from *B. subtilis* sp. strain B38 newly isolated from soil. Applied biochemistry and Biotechnology, 157(3): 407-419.

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman N, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Appl Envir Microbiol, 75(3): 748-757.

Takagi H, Miyauchi A, Kadowaki K, Udaka S. 1989. Potential use of *Bacillus brevis* HPD31 for the production of foreign proteins. Agric. Biol. Chem., 53: 2279-2280.

Takahashi W, Yamagata H, Yamaguchi K, Tsukagoshi N, Udaka S. 1983. Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a Protein-Secreting Bacterium, by Plasmid DNA. Journal of Bacteriology, 156(3): 1130-1134.

Takahiro A, Hidehiko Y, Norihiro T, Udaka S. 1989. Multiple and tandemly arranged promoters of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47. Journal of Bacteriology, 1010-1016.

Takayuki M, Hirosuke S. 2007. Erwinia isolates from the bacterial shoot blight of pear in Japan are closely related to *Erwinia pyrifoliae* based on phylogenetic analyses of *gyrB* and *rpoD* genes. Journal of General Plant Pathology, 73: 53.

Tamura K, Dukley J, Ndi M, Kumar S. 2007. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software version 4.0. Molecular Biology And Evolution, 24: 1596-1599.

Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects For inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the national academy of sciences (USA), 101: 11030-11035.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher Glen ,Nei M, Kunar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.

Tanaka K, Shiina T, Takahashi H. 1988. Multiple principal sigma factor homologs in eubacteria: Identification of “rpoD box”. Science, 242: 1040-1042.

Taylor R. 1961. Aggregation variance and mean. Nature, 189: 732-735.

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeaanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876-4882.

Thwaite J E, Baillie L W J, Carter N M, Stephenson K, Rees M, Harwood C R, Peter. 2002. Optimization of the cell wall microenvironment allows increased production of recombinant Bacillus anthracis protective antigen from *B. subtilis*. Applied Environmental Microbiology, 68: 227-234.

Timmusk S, Nicander B, Granhall U, Tillberg E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry, 31: 1847-1852.

Tietyen J L, Nevins D J, Shoemaker C F, Schneeman B O. 1995. Hypocholesterolemic potential of oat bran treated with an Endo-β-D-glucanase from *Bacillus subtilis*. Journal of Food Science, 60(3): 558-560.

Tiquia S M, Lloyd J, Herms D A, Hoitink H A J, Michel F C. 2002. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rRNA genes. Applied Soil Ecology, 21(1): 31-48.

Tiquia S M, Wan J H C, Tam N F Y. 2002. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. Compost Science and Utilization, 10(2): 150-161.

Torres P A, Abril A B, Bucher E H. 2005. Microbial succession in litter decomposition in the semi-arid Chaco woodland. Soil Biol Bioehem, 37(1): 49-54.

Torsvik V, Øvrâs I. 2002. Microbiol diversity and function in soil: From genes to ecosystems. Current Opinion Microbiol, 5: 240-245.

Tourova T P, Korshunova A V, Mikhailova E M, Sokolova D S, Poltaraus A B, Nazina T N. 2010. Application of *gyrB* and *parE* sequence similarity analyses for differentiation of species within the genus *Geobacillus* microbiology. Mikrobiologiya, (79) 3: 376-389.

Tripa K A, Verma S C, Chowdhury S P, Lebuhn M, Gattinger A, Schloter M. 2006. Ochrobactrum oryzae sp nov, an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India. Int J Syst Evol Microbiol, 56: 1677-1680.

Trivedi P, Spann T, Wang N. 2011. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. Microbial Ecology, 62(2): 324-336.

Tuomi W V, Kazlauskas R J. 1999. Molecular basis for enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. Journal of Organic Chemistry, 64(8): 2638-2647.

Udaka S, Yamagata H. 1993. Protein secretion in *Bacillus brevis*. Antonie van Leeuwenhoek, 64: 137-143.

Udaka S, Tsukagoshi N, Yamagata H. 1989. Bacillus brevis, a host bacterium for efficient extracellular production of useful proteins. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 113-146.

Udaka S, Yamagata H. 2008. Protein secretion in Bacillus brevis. Antonie van Leeuwenhoek, 64: 137-143.

Ulrich K, Ulrich A, Ewald D. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. FEMS Microbiology Ecology, 63(2): 169-180.

Unge A, Jansson J. 2001. Monitoring population size, activity, and distribution of gfp-luxAB-tagged *Pseudomonas fluorescens* SBW25 during colonization of wheat. Microbial Ecology, 41(4): 290-300.

Unge A, Tombolini R, Molbak L,Jansson J K. 1999. Simultaneous mornitoring of cell number an d metabolic activity of specific bacterial populations with a dual gfp/luxAB marker system. Applied and Environmental Microbiology, 65(2): 813-821.

Urszula J, Maria S B, Elzbieta S. 2012. Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. Journal of Bioscience and Bioengineering. 113(1): 30-35.

Uttam C B, Rajesh K S, Wamik A, Raman S. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. Process Biochemistry, 35: 213-219.

Valverde A, Gonzalez-Tirante M, Medina-Sierra M, Santa-Regina I, Garcia-Sanchez A, Igual J M. 2011. Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten-tin mining area. Chemosphere, 85(1): 129-134.

Van Loon L C, Bakker P A, Pieterse C M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36: 453-483.

Vanessa M C, Christopher M, Franco M. 2004. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and

sequencing of 16S rRNA clones. Applied and Environmental Microbiology, 70(3): 1787-1794.

Vestal J R, White D C. 1989. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. Bioscience, 39: 535-541.

Vigdis T, Lisc O. 2002. Microbiol diversity and function in soil: from gene to ecosystem. Current Opinion in Microbiology, 5: 240-245.

Vimal B M, Vipul G, Ashvinkumar N M, Patel R R, Chhatpar H S. 2008. Biological control of Fusarium wilt of pigeonpea by *Pantoea dispersa*, a field assessment. Annals of Microbiology, 58(3): 411-419.

Vivas A, Biras , Niras Aa, Barea J M, Azcon R. 2006. Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. Soil Biology and Biochemistry, 38(9): 2694-2704.

Wang A H, Yin Y P, Xiong H L, Li J, Xian J X, Wang Z K. 2010. Endophytic bacterial diversity analysis of huanglongbing pathogen-infected citrus phloem tissue in guangxi. Scientia Agricultura Sinica, 43(23): 23.

Wang G, Zhang X W, Wang L,Wang K K, Peng F L, Wang L S. 2012. The activity and kinetic properties of cellulases in substrates containing metal ions and acid radicals. Advances in Biological Chemistry, 2(4): 390-395.

Wang J J, Rojanatavorn K, Shih J C. 2004. Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the kerA gene. Biotechnology Bioengineering, 87(4): 459-464.

Wang J J, Swaisgood H E, Shih J C. 2003. Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* system. Biotechnology Bioengineering, 81(4): 421-429.

Wang L P, Chu F, Xie W. 2007. Accurate cancer classification using expressions of very few genes. IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, 4(1): 40-53.

Wang L T, Lee F L, Tai C J, Kasai H. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(8): 1846-1850.

Washington H G. 1984. Diversity, biotic and similarity indices: A review with special relevance to aquatic ecosystems. Water Research, 18(6): 653-694.

Watanabe I, Rogor P A. 1984. Nitrogen fixation in wetland rice field, *In*: Subba R N S. Current Development in Biological Nitrogen Fixation. Oxford and IBH Pub Co, Britain, 237-276.

Watanabe K, Nelson J, Harayama S, Kasai H. 2001. ICB database: The gyrB database for identification and classification of bacteria. Nucleic Acids Research, 29(1): 344-345

Wei Y, shih J, Li J, Goodwin P H. 2002. Two pectin lyase genes, pnl-1 and pnl-2, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. Microbiology, 148(7): 2149.

Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D L. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697-703.

Welch D F. 1991. Applications of cellular farry acid analysis. Clinical Microbiology, 4(4): 422-438.

Weng F Y, Chiou C S, Lin P H P. 2009. Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. Journal of Applied Microbiology, 107(2): 452-464.

Werf M J V D, Swarts H J, Bont J A D. 1999. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. Applied Environmental Microbiology, 65(5): 2092-2102.

White D C, Davis W M, Nickels J S, King J D, Bobbie R J. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. Oecologia, 40: 51-62.

Whittaker R H. 1972. Evolution and measurement of species diversity.Taxon, 21(2/3): 213-251.

William J W, George B C. 1968. Variation in the fine structure of a marine achromobacter and a marine pseudomonad grown under selected nutritional and temperature regimes. Bacteriol, 95: 1874-1886.

Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochemical Journal, 322(Pt3): 681-692.

Wolf A F A, Hagemann M. 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. Int J Syst Evol Microbiol, 52(6): 1937-1944.

Wong K K Y, Tan L U L, Saddler J N. 1988. Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms: Function and applications. Microbiol. Rev, 52: 305-317.

Wubben J P, Mulder W, ten Have A. 1999. Cloning and partial characterization of endopalygalactumnase genes from *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1596.

Xu D, Côté J-C. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3′ end 16S rDNA and 5′ end 16S–23S ITS nucleotide sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 695-704.

Xue Q Y, Chen Y, Li S M, Chen L F, Ding G C, Guo D W, Guo J H. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and Enterobacter as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. Biological Control, 48(3): 252-258.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa W. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group ii to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*, (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Japanese Journal of Microbiology, 36(12): 1251-1275.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralst on, Palleroni, Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. comb. nov, *Ralstonias olanacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstoniae utropha*(Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology, 39: 897-904.

Yamada S, Ohashi E, Agata N, Kasthuri V. 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensi*s, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1483-1490.

Yamagata H, Nakahama K, Suzuki Y, Kakinuma A, Tsukagoshi N, Udaka S. 1989. Use of Bacillus brevis for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3589-3593.

Yang P X, Ma L, Chen M H, Xi J Q, Feng H E, Duan C Q, Mo M H, Fang D H, Duan Y Q, Yang F X. 2012. Phosphate solubilizing ability and phylogenetic diversity of bacteria from P-rich soils around Dianchi Lake drainage area of China. Pedosphere, 22(5): 707-716.

Yazdani M, Naderi-Manesh H, Khajeh K, Soudi M R, Asghari S M, Sharifzadeh M. 2009. Isolation and characterization of a novel gamma-radiation-resistant bacterium from hot spring in Iran. Journal of Basic Microbiology, 49(1): 119-127.

Yong H K, In Sung K, Eun Young M, Jeong S P, Sang J K, Ioo H L, Byung T P, Eun Ju L. 2011. High abundance and role of antifungal bacteria in compost-treated soils in a wildfire area. Microbial Ecology, 62(3): 725-737.

Yoon J H, Kim I G, Kang K H, Oh T K, Park Y H. 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. Int J Syst Evol Microbiol, 53(Pt 5): 1297-1303.

Yoon J H, Lee J S, Kook S Y, Park Y H, Lee S T. 1997. Reclassification of Nocardioides simplex ATCC 13260, ATCC 19565, and ATCC 19566 as Rhodococcus erythropolis. International of systematic bacteriology, 47(3): 904-907.

Yoon J H, Lee J S, Shin Y K, Park Y H, Lee S T. 1997. Reclassification of *Nocardioides simplex* ATCC 13260, ATCC 19565, and ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*.International Journal of Systematic Bacteriology, 47(3): 904-907.

Yumoto I, Hirota K, Yamaga S, Nodasaka Y, Kawasaki T, Matsuyama H, Nakajima K. 2004. *Bacillus asahii* sp. nov., a novel bacterium isolated from soil with the ability to deodorize the bad smell generated from short-chain fatty acids. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(Pt 6): 1997-2001.

Zani J L, Cruiz F W D, Santos A F D, Gil-Turnes C. 1998. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. Journal of Applied Microbiology, 84(1): 68-71.

Zareen K, Sharon L. 2009. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. Plant and Soil, (2): 197-207.

Zelles L, Bai Y Q, Rackwitz R, Chadwick D, Beese F. 1995. Determination of phospholipid and lipopolysaccharide-drived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structure in soils. Biol Fertil Soils, 19: 115-123.

Zeng S R, Ke Y, Fang B Y, Zhang L Q. 2005. Diversity and correlation of endophytic fungi and rhizosphere fungi isolated from *Diphylleia sinensis*. Journal of Zhuzhou Institute of Technology, 19(001): 25-27.

Zhang J, Wang J, Fang C, Song F, Xin Y, Qu L, Ding K. 2010. *Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 60(Pt 12): 2924-2929.

Zhang Y Z, Chen W F, Li M, Sui X H, Liu H C ,Zhang X X, Chen W X. 2012. *Bacillus endoradicis* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from soybean root. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 359-363.

Zhao J Z, Li Y X, Collins H L, Cao J, Earle E D, Shelton A M. 2001. Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (lepidoptera: plutellidae) resistant to bacillus thuringiensis toxin cry1c.Journal of Economic Entomology, 94(6): 1547-1552.

Zhao M Q, Wang B X, Li F X, Qiu L Y. 2007. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology. Appl Microbiol Biotechnol, 73: 1435-1440.

Zheng S P, Chen B, Guan X, Zheng W W. 2008. Diversity analysis of endophytic bacteria within Azolla microphylla using PCR-DGGE and electron microscopy. Journal of Agricultural Biotechnology, 16(3): 508-514.

Zhou T, Paulitz T C. 1994. Induced resistance in the biological control of *Pythium aphanidermatum* by Pseudomonas spp. Journal of Phytopathology, 142(1): 51-63.

Zhu Y J, Liu B, Sengonca C. 2005. Efficiency of *B. thuringiensis* with Abamectin on different agricultural pests and their natural enemies. Gttingen: Cuvillier Verlag Gttingen: 1-3.

Zou W X, Tan R X. 1999. Biological and chemical diversity of endophytes and their potential applications. *In*: Li C S. Advances in Plant Sciences. Beijing: China Higher Education Press: 183-190.

中 文 索 引

F

G

H

J

K

L

M

N

Q

R

S

T

W

X

Y

Z

拉丁文索引

A

B

C

D

G

L

M

P

S

V

（Q-3715.01）

福建省农业科学院芽胞杆菌研究团队研究领域包括芽胞杆菌资源学、分类学、基因组学、代谢组学、物质组学、酶学、脂肪酸组学、发酵工艺学、生物防治应用、生物基质应用、生物肥料应用、环境修复应用、益生菌应用、生物原料应用等，将陆续出版相关著作为研究和应用服务。

科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail:lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn
销售分类建议：微生物学

赛拉艾芙
生命科学订阅号

本书彩图及更多
资源请扫码

生命因你而精彩！

定　价：328.00 元